

**T.C**  
**BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**OBSTRÜKTİF UYKU APNE SENDROMUNDA DEMİR**  
**METABOLİZMASININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Alpaslan SAVRAN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Yrd. Doç. Dr. Berrak GÜVEN**

**ZONGULDAK**

**2014**

**T.C**  
**BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**OBSTRÜKTİF UYKU APNE SENDROMUNDA DEMİR**  
**METABOLİZMASININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Alpaslan SAVRAN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Yrd. Doç. Dr. Berrak GÜVEN**

**ZONGULDAK**

**2014**

## TEZ ONAY TUTANAĐI

**Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte:** Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi

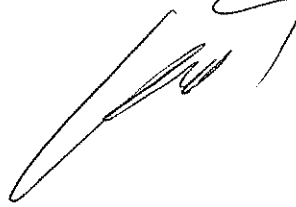
**Tez Başlığı :** Obstrüktif Uyku Apne Sendromunda Demir Metabolizmasının Değerlendirilmesi

**Tez Yazarı :** Arř. Gör. Dr. Alpaslan SAVRAN

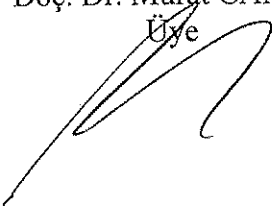
**Tez Savunma Tarihi:** 02/12/2013

**Tez Danışmanı :** Yrd. DoÇ. Dr. Berrak GÜVEN

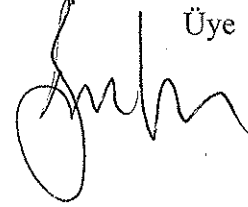
Prof. Dr. A. Görkem MUNGAN  
Jüri Başkanı



DoĐ. Dr. Murat CAN  
Üye

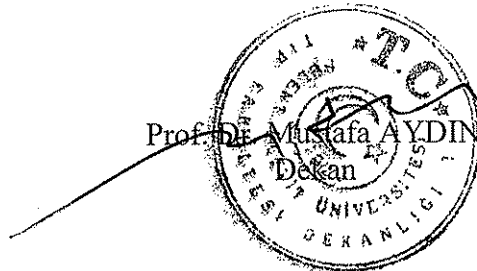


Yrd. DoĐ. Dr. Berrak GÜVEN  
Üye



UYGUNDUR  
03/02/2014

Prof. Dr. Mustafa AYDIN  
DeĐkan



## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, tez çalışmamın planlanıp yürütülmesi sürecinde desteklerini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Berrak Güven'e,

Değerli hocalarım Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. A. Görkem Mungan başta olmak üzere, Doç Dr. Murat Can'a ve Doç. Dr. Şerefden Açıkgöz'e,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, iyi ve kötü günlerimi paylaştığım Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki asistan, teknisyen ve personel arkadaşlarıma,

Tez hastalarımın temin edilmesinde ve numunelerin toplanmasına katkıda bulunan Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr Tacettin Örnek'e

Tez çalışmamın istatistiksel olarak planlanması ve analizini yapan Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Vildan Sümbüloğlu'na ve Yrd. Doç. Dr. Fürüzan Köktürk'e,

Tez çalışmamın yürütülmesi için maddi destek sağlayan Bülent Ecevit Üniversitesi Rektörlüğü'ne,

Her zaman bana destek olan, yaşamım boyunca bana güvenen ve sevgilerini benden esirgemeyen, başta annem ve babam olmak üzere ablama ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

**Dr. Alpaslan SAVRAN**

**Zonguldak, 2014**

## ÖZET

**Alpaslan Savran, Obstrüktif Uyku Apne Sendromunda Demir Metabolizmasının Değerlendirilmesi. Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Tezi. Zonguldak, 2014.**

**Amaç:** Obstrüktif uyku apnesi, uyku sırasında solunumun tekrarlayan kesintileriyle karakterizedir. Bu çalışmada, obstrüktif uyku apnesinde sistemik demir dengesini etkileyen belirteçleri incelemeyi amaçladık.

**Materyal ve metot:** Çalışmaya polisomnografiyle tanı konulan obstrüktif uyku apneli 37 hasta ve 36 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Hastalar apne-hipopne indeksine göre (hafif < 5-15, orta 15-30, ağır >30) üç gruba ayrıldı. Açlık kan örnekleri toplandı ve demir, demir bağlama kapasitesi, ferritin, IL-6, hsCRP, soluble transferrin reseptörü, hepsidin, hemojuvelin için analiz edildi. Demir ve demir bağlama kapasitesi kolorimetrik metot kullanılarak analiz edildi. Ferritin, IL-6, hsCRP, soluble transferrin reseptör, hepsidin ve hemojuvelin ELISA ile analiz edildi. Sonuçlar Mann-Whitney U test ve Pearson veya Spearman correlation coefficient istatistiksel testleri kapsayan istatistiksel paket (SSPS 18) ile değerlendirildi. P <0.05 değerleri anlamlı kabul edildi.

**Bulgular:** IL-6, hsCRP, ferritin, soluble transferrin reseptör ve hemojuvelin obstrüktif uyku apnesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi. Demir ve total demir bağlama kapasitesi, hepsidin değerleri ise farklı değildi. Apne-hipopne indeksi ve parametreler (demir, demir bağlama kapasitesi, ferritin, IL-6, hsCRP, soluble transferrin reseptörü, hepsidin, hemojuvelin) arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon yoktu ( $p > 0.05$ ). IL-6 ve hsCRP arasında ( $r=0.322$ ,  $p=0.005$ ), hsCRP ve soluble transferrin reseptör ( $r=0.318$ ,  $p=0.006$ ), ve ferritin ile hemojuvelin ( $r=0.925$ ,  $p<0.0001$ ) arasında anlamlı korelasyon olduğunu gösterdik.

**Tartışma:** Çalışmamızda, obstrüktif uyku apnesinde IL-6, hsCRP, ferritin, soluble transferrin reseptörü, ve hemojuvelinin arttığını izledik. Ancak, obstrüktif uyku apnesinde hepsidin, demir ve total demir bağlama kapasitesi artışı olmadı. Detaylı yapılacak çalışmalar obstrüktif uyku apnesinde demirin tam mekanizmasını açıklamak için planlanmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Obstrüktif Uyku Apne Sendromu, IL-6, Hepsidin, Hemojuvelin

## ABSTRACT

**Alpaslan Savran, Evaluation of iron metabolism in Obstructive Sleep Apnea Syndrome. Bülent Ecevit University Faculty of Medicine, Thesis in Medical Biochemistry. Zonguldak, 2014.**

**Aim:** Obstructive sleep apnea is characterized by repeated disruptions of breathing during sleep. In this study, we aimed to investigate markers that affect systemic iron balance in obstructive sleep apnea.

**Material and methods:** This study including 37 patients with obstructive sleep apnea, evaluated by polysomnography and 36 healthy volunteer. The patients were divided into three groups according to their apnea-hypopnea index ( mild <5-15, moderate 15-30, severe > 30). Fasted blood samples were collected and samples were analyzed for iron, total iron binding capacity, ferritin, IL-6, hsCRP, soluble transferrin receptor, hepcidin, hemojuvelin. Iron and total iron binding capacity were measured using an colorimetric method. Ferritin, IL-6, hsCRP, soluble transferrin receptor, hepcidin and hemojuvelin were measured by ELISA. Results were assessed by Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 18), using statistical tests including Mann-Whitney U test and Pearson's or Spearman's correlation coefficient. P value < 0.05 was considered as a significant level.

**Results:** IL-6, hsCRP, ferritin, soluble transferrin receptor and hemojuvelin showed a statistically significant increase in obstructive sleep apnea. Iron and total iron binding capacity, hepcidin values did not differ. There was no a statistically significant correlation between apnea-hypopnea index and parameters (iron, total iron binding capacity, ferritin, IL-6, hsCRP, soluble transferrin receptor, hepcidin and hemojuvelin) ( $p > 0.05$ ). We demonstrated a statistically significant correlation, IL-6 between hsCRP ( $r=0.322$ ,  $p=0.005$ ), hsCRP between soluble transferrin receptor ( $r=0.318$ ,  $p=0.006$ ) and ferritin between hemojuvelin ( $r=0.925$ ,  $p<0.0001$ )

**Conclusion:** In our study, we found higher IL-6, hsCRP, ferritin, soluble transferrin receptor and hemojuvelin in obstructive sleep apnea. However, hepcidin, iron and total iron binding capacity are not elevated in obstructive sleep apnea. Further studies with detailed must be planned to explain the exact mechanism of iron in obstructive sleep apnea.

**Keywords:** Obstructive sleep apnea syndrome, IL-6, Hepcidin, Hemojuvelin

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖNSÖZ .....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİL DİZİNİ .....	ix
TABLolar DİZİNİ .....	x
1.GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Obstrüktif Uyku Apne Sendromu (OUAS).....	2
2.2. OUAS Risk Faktörleri.....	2
2.2.1. Yaş .....	2
2.2.2. Cinsiyet .....	2
2.2.3. Obezite .....	3
2.2.4. Irk .....	3
2.2.5. Sigara, alkol ve sedatif kullanımı.....	3
2.2.6. Anatomik faktörler .....	4
2.2.7. Eşlik eden hastalıklar .....	4
2.3. OUAS Etyolojisi .....	4
2.4. OUAS'nun Klinik Özellikleri ve Tanısı .....	5
2.4.1. OUAS'nun klinik özellikleri .....	5
2.4.2. Tanı .....	6
2.5. OUAS'nda Görülen Sistemik Değişikler .....	6
2.5.1. İnflamasyon.....	6
2.5.2. Hematolojik sistem .....	7
2.5.3.Kardiyovasküler sistem.....	7
2.6. Demir .....	8
2.6.1. Demir emilimi ve mobilizasyonu.....	9
2.6.2. Demirin hücrelere taşınması ve alınması .....	11
2.7. Transferrin reseptörü (TfR).....	11

2.8. Ferritin.....	12
2.9. Hepsidin .....	13
2.10. Hemojuvelin.....	15
2.11. İnterlökin (IL-6) .....	16
2.12. CRP .....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	19
3.1. Hasta Grubu .....	19
3.2. Örneklerin Toplanması.....	19
3.3. Ölçümler Sırasında Kullanılan Cihazlar .....	20
3.4. Test Ölçümleri.....	20
3.4.1. Serum demir ölçümü .....	20
3.4.2. Unsature demir bağlama kapasitesinin (UDBK) ölçümü.....	22
3.4.3. Ferritin ölçümü.....	23
3.4.4. Solubl transferrin reseptör ölçümü.....	24
3.4.5. Hepsidin ölçümü .....	26
3.4.6. hsCRP ölçümü.....	28
3.4.7. IL-6 ölçümü.....	30
3.4.8. Hemojuvelin ölçümü .....	33
3.5. İstatistiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR .....	35
5. TARTIŞMA .....	38
6. SONUÇLAR .....	41
7. KAYNAKLAR .....	42
8. EKLER.....	59
Ek 1. Etik Kurul Onayı.....	59



## KISALTMALAR DİZİNİ

ABC	: Avidin-Biyotin-Peroksidaz Kompleksi
ADMA	: Asimetrik Dimetil Arjinin
AHI	: Apne Hipopne İndeksi
BMP	: Kemik Morfojenik Protein
CPAP	: Continuous positive airway pressure
CRP	: C-Reaktif Protein
Dcytb	: Duodenal sitokrom b
DMT-1	: Divalent Metal Transporter-1
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EEG	: Elektro Ensefalo Gram
ELİSA	: Enzim Bağlı İmmün Ölçüm
EKG	: Elektro Kardiyo Grafi
EMG	: Elektro Myo Gram
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
EOG	: Elektro Okülo Gram
EPO	: Eritropoetin
ERK	: Hücre dışı sinyal regüle kinaz
F7a	: Aktive pıhtılaşma faktörü 7
F12a	: Aktive pıhtılaşma faktörü 12
Gp130	: Glikoprotein 130
HAMP	: Hepatik antimikrobiyal peptid
HCP-1	: Hem Taşıyıcı protein-1
HFE2	: Hemokromatozis tip-2 (juvenil)
HIF-1	: Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1
HJV	: Hemojuvelin
Hox-1	: Hem oksijenaz-1
hsCRP	: Yüksek duyarlıklı CRP
ICAM-1	: İntersellüler Adezyon Molekül 1
IL	: Interlökin
JAK	: Janus Kinaz

kDa	: Kilo Dalton
KOAH	: Kronik Obstrütif Akciğer Hastalığı
MAPK	: Mitojen Aktiflenmiş Protein Kinaz
MCP-1	: Monosit Kemotaktik Protein-1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: Sodyum di hidrojen fosfat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	: Di sodyum hidrojen fosfat
Nf-κβ	: Nükleer Faktör- κβ
NO	: Nitrik Oksit
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitör-1
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
RGM	: Repulsive Guidance Molekül
SHP-2	: Src homoloji-2
SMAD	: Son of Mothers Against Decapentaplegic
STAT-3	: Sinyal Dönüştürücü ve Aktivatör Transkripsiyon 3
STEAP3	: Six Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate Family Member-3
sTfR	: Solubl transferin reseptörü
TDBK	: Total Demir Bağlama Kapasitesi
TfR	: Transferrin reseptörü
TMB	: Tetra Metil Benzidin
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü alfa
UDBK	: Unsatüre Demir Bağlama Kapasitesi
ÜSY	: Üst Solunum Yolu
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi

## ŞEKİL DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: Demirin barsak hücrelerinden emilimi, barsak hücrelerinden ve makrofajlardan plazmaya geçişi .....	10
Şekil 2: Transferrin reseptörü ve solubl transferin reseptörü. ....	12
Şekil 3: Hepsidin etkileri.....	14
Şekil 4: Hepsidin sentezi sinyal yolları .....	15

## TABLULAR DİZİNİ

<b><u>Tablo</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Tablo 1: Serum demiri çalışma prosedürü .....	21
Tablo 2: Unsature demir bağlama kapasitesi (UDBK) çalışma prosedürü .....	22
Tablo 3: sTfR çalışma prosedürü .....	26
Tablo 4: Hepsidin çalışma prosedürü.....	28
Tablo 5: hsCRP çalışma prosedürü .....	30
Tablo 6: IL-6 çalışma prosedürü .....	32
Tablo 7: Hemojuvelin çalışma prosedürü .....	34
Tablo 8: Hastalara ve kontrollere ait demografik özellikler .....	35
Tablo 9: OUAS hasta grubu ve kontrol grubunun ölçüm değerlerinin karşılaştırılması	35
Tablo 10: AHI gruplarının kontrol grubuyla karşılaştırılması .....	36
Tablo 11: Parametreler arasındaki korelasyonların karşılaştırılması. ....	37

## 1.GİRİŞ

OUAS, uyku sırasında havayolu tıkanıklığı nedeniyle hipoksi/apne ataklarının görüldüğü, oldukça sık görülen bir sendromdur (1).

OUAS'nda ataklar sırasında görülen oksihemoglobin desatürasyonu ve desatürasyonu izleyen hızlı reoksijenasyonla oluşan tekrarlayan kısa döngülü hipoksi, oksidatif strese ve NF- $\kappa$ B ile ilişkili inflamatuvar yolların aktivasyonuna neden olur (2,3). Birçok çalışmada OUAS'nda inflamatuvar sitokinlerin arttığı, özellikle TNF- $\alpha$ 'nın bu inflamasyonda direkt rol oynadığı gösterilmiştir (4,5). Hücre içinde oksijen homeostazisinin ana düzenleyicisi olan HIF-1 sinyal yolu, hipoksi durumunda hücrenin adaptasyon cevabını oluşturmasını sağlar (6). Aralıklı oluşan hipoksizde HIF-1 upregülasyona uğrar ve eritropoetin gen transkripsiyonunu aktive eder (7,8). Eritropoetin hormonuyla aktive edilen eritropoezis ile oksijen taşıma kapasitesi artırılmaya çalışılır.

Demir, eritrositlerde hemoglobin yapısında oksijen taşıyıcı olarak görev alan bir elementtir. Yetişkin bireylerde başlıca eritropoeziste kullanılmak üzere günde 25 mg demir ihtiyacı bulunmaktadır. Demir sirkulasyonda transferine bağlanarak taşınır ve transferrin reseptörü ile hücrelere alınır. Eritropoeziste artmış demir ihtiyacının temini için eritroid öncüllerde transferrin reseptörü yüksek oranda eksprese edilir (9).

Hepsidin karaciğerden salınan ve eritropoezis de kullanılan demirin homeostazisini sağlayan, önemli bir hormondur. Bu hormon aracılığıyla demirin barsaklardan emilimi ve makrofajlardan dolaşıma salınımı azaltılarak, sistemik demir regülasyonu sağlanır (10). Hemojuvelin, hepsidin ekspresyonunu BMP sinyal yoluyla indükleyen bir membran proteindir (11). BMP sinyal yolu dışında proinflamatuvar sitokinler, özellikle IL-6, STAT-3 yoluyla hepsidinin ekspresyonunu artırır (12).

Biz bu çalışmada, hipoksiyle karakterize OUAS hastalarında literatürde ilk kez gösterilecek olan demir metabolizmasının belirteçlerini değerlendirmeyi amaçladık.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Obstrüktif Uyku Apne Sendromu (OUAS)**

OUAS, üst solunum yolu instabilitesi nedeniyle uyku sırasında horlama, solunumun azalması (hipopne) veya kesilmesiyle (apne) karakterize atakların görüldüğü bir sendromdur.

OUAS genel popülasyonda oldukça yaygın görülen bir sendromdur (13). Solunumsal hastalıklar arasında ise astımdan sonra görülen en sık ikinci hastalıktır (14). Yapılan çalışmalarda erişkin erkeklerdeki prevalansı %3-7, erişkin kadınlardaki prevalansı %2-5 aralığında bulunmuştur (13). Türkiye’de yapılan çalışmalara ait OUAS prevalansı ise %0.9-1.9 arasında olduğu görülmüştür (15).

Üst solunum yolunu daraltan ya da tıkanmasını kolaylaştıran faktörler OUAS riskini artırmaktadır. Bu risk faktörleri aşağıda tanımlanmıştır.

### **2.2. OUAS Risk Faktörleri**

#### **2.2.1. Yaş**

OUAS’nda prevalansın 40-65 yaş grubunda arttığı ve 65 yaşından sonra azaldığı bildirilmektedir (16,17). Yaşlanma ile birlikte yağ dağılımı, doku esnekliği, solunum kontrolü, akciğer ve kardiyovasküler fonksiyonlarda görülen değişimlerin üst solunum yolu obstrüksiyon olasılığını arttırdığı düşünülmektedir (18). OUAS erişkin dönemi dışında çocukluk çağında da görülebilir. 2-8 yaş aralığındaki çocukların %2’si adenotonsiller hipertrofi ile ilişkili olarak meydana gelen OUAS’ndan etkilenmektedir (19).

#### **2.2.2. Cinsiyet**

Orta yaş döneminde erkeklerde OUAS sıklığı kadınlardan daha fazla bildirilmiştir. Klinik başvurulara dayalı çalışmalarda kadınlarla karşılaştırıldığında, erkeklerde OUAS görülme riski 5 ile 8 kat artmış olarak bulunmuştur (20). Popülasyon tabanlı

yapılan çalışmalarda ise OUAS görülme riskinin, kadınlara göre erkeklerde 2 ile 3 kat artmış olduğu gösterilmiştir (1,21). Erkeklerde kadınlara göre daha uzun hava yolu olması, erkeklerde OUAS sıklığının daha yüksek olmasının en belirgin nedenlerinden biri olarak görülmektedir (22,23). Mesleki ve çevresel etkenler, üst solunum yolu yapısı ve kompliyansı, yumuşak doku yapısı ve bölgesel yağ dağılımı gibi nedenlerin OUAS'nun cinsiyete bağlı görülme sıklığını etkilediği düşünülmektedir (24). Kadınlarda ise menopoz öncesi döneme göre postmenopozal kadınlarda OUAS'nun görülme sıklığının en az dört kat arttığı gösterilmiştir (21).

### **2.2.3. Obezite**

Obezite OUAS'nun gelişimi için majör bir risk faktörüdür (25). Bu hastaların %70'nin obez olduğu tespit edilmiştir (26). OUAS riski VKİ >29 olanlarda 8-12 kat artmıştır. Üst vücut obezitesi olanlarda ve VKİ >40'dan büyük olan morbid obezlerde bu risk daha yüksektir (18,27). Çalışmalar kilonun modifiye edilebilir bir risk faktörü olduğuna işaret etmektedir (28,29). Sabit kiloya göre 4 yıllık bir periyotta kiloda %10'luk bir kayıp apne-hipopne indeksi'nde (AHI) % 23'lük azalmaya neden olurken, kiloda %10'luk artış ılımlı veya ağır OUAS gelişiminde 6 katlık bir risk artışına ve AHI'de %32'lik artışa neden olmaktadır (28).

### **2.2.4. Irk**

Amerikalı beyaz ve Afro-amerikan gruplar arasında yapılan çalışmada elde edilen verilerde, Afro-amerikanlarda OUAS prevalansının daha yüksek olduğu görülürken, ayrıca OUAS'nun daha ağır düzeyde seyrettiği bildirilmiştir (30).

### **2.2.5. Sigara, alkol ve sedatif kullanımı**

Yapılan çalışmalarda sigara içenlerde 3 kat daha fazla OUAS riski olduğu tespit edilmiştir (31). Sigara ve çevresel maruziyete bağlı olarak hava yolu inflamasyonunun artması, alkol ve sedatif ilaç kullanımının ise üst solunum yolunda hipoglossal

sinirde iletiyi azaltarak nöromusküler aktivitede azalmaya sebep olması OUAS için bir risk teşkil etmektedir (16,32,33).

### **2.2.6. Anatomik faktörler**

Boyun çevresi ölçümü OUAS için belirleyici bir faktördür. Boyun çevresinin erkeklerde 43 cm, kadınlarda ise 38 cm üstünde olması bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (27). Çocukluk çağında görülen adenotonsiller büyüme, fasyal dismorfizm ya da mandibuler anormallikler (özellikle mikrognati) gibi bozuklukların OUAS ile birlikteliğinin sık olduğu tespit edilmiştir (34).

### **2.2.7. Eşlik eden hastalıklar**

Üst solunum yolu anormalliklerinde, akciğer (KOAİ vb.), endokrin (Diyabetes mellitus, Hipotroidi), psikiyatrik ve nöromusküler (Amyotrofik Lateral Skleroz, Multiple Skleroz) birçok hastalıkta OUAS daha sık görülmektedir (24).

## **2.3. OUAS Etiyolojisi**

Üst solunum yolu (ÜSY) konuşma, yutma ve solunum gibi fonksiyonların gerçekleştiği, kas dokusundan oluşan tüp şeklinde bir yapıdır. Yumuşak dokulardan oluşan ÜSY'nin rijit bir desteği bulunmamaktadır, bu nedenle kollabe olmaya eğilimlidir (35). Erkeklerde kadınlara göre hava yolunun daha uzun olması, erkeklerde OUAS prevalansının daha yüksek olmasının nedenlerinden biri olarak görülmektedir (22,23). Parafarengeal yağ dokusundaki artışa neden olarak ÜSY'nun daha kolay kollabe olmasına yol açan obezite de OUAS gelişiminde önemli bir etkidir (22,23). ÜSY'nun kesit alanında azalmaya neden olan değişikliklerin, OUAS'nun şiddeti ile korele olduğu görülmüştür (22,23). Mekanik (septal deviasyon, nazal polip gibi) ya da inflamatuvar/vazomotor (akut /kronik rinit gibi) nedenlere bağlı nazal obstrüksiyon, makroglossi ve tonsiller hipertrofi gibi nedenler OUAS patogenezinde rol oynamaktadır (22,23,36,37) Ayrıca sırt üstü yatış gibi



postür değişikleri de dil ve palatal yapıların posteriora doğru yer değiştirmesine neden olarak hava yolu kesit alanını daraltmaktadır (35).

## **2.4. OUAS'nun Klinik Özellikleri ve Tanısı**

### **2.4.1. OUAS'nun klinik özellikleri**

OUAS'nun semptomları gece ve gündüz görülenler olmak üzere ikiye ayrılır (14).

OUAS'nun en sık görülen ve karakteristik gece semptomları sırasıyla horlama ve apnedir (14). Horlama OUAS'nun en yaygın semptomudur. Tüm hastaların % 95'inde görülür (38). Ancak horlamanın, normal yetişkinler arasında çok yaygın görülen bir bulgu olması nedeniyle (kadınlarda %25-30'unu, erkeklerde %40-45) tanısal değeri azdır (39).

Uyku sırasında solunumun durması, uyku kliniğine hastanın başvurusunda horlamayla birlikte görülen yaygın bir semptomdur (38). Uyku sırasında solunumun durması tanı koydurucudur, ancak hastalığın şiddetini göstermez (40). OUAS'lu olguların % 5-10'unda hava yolundaki daralma tam tıkanmaya (apne) neden olur. Gelişen apneyi takiben kanda parsiyel O<sub>2</sub> basıncı ve pH düşerken, parsiyel CO<sub>2</sub> basıncı yükselir. Bu gelişmeler santral sinir sistemi kemoreseptörlerini uyararak, kişinin apneden kurtulması için refleks olarak uyanmasına, tekrar kasların tonusunun artmasına ve negatif basıncı yenerek kollabe bölgenin açılmasına neden olur. Dolayısı ile hava akımı tekrar başlar, apne ortadan kalkar. Parsiyel O<sub>2</sub> basıncı ve pH yükselir, parsiyel CO<sub>2</sub> basıncı düşer. Kişi tekrar uykuya dalar. Bu şekilde uykuya dalma, apne, uyanma periyotları uyku boyunca devam eder (24). OUAS'nda sık görülen gece semptomlarına insomni, noktüri, enürezis, diyaforez ve impotans gibi daha az görülen bulgular eşlik edebilir (41).

Uyku hali, OUAS'nun en önemli gündüz semptomudur (38). Gündüz görülen uyku haline yorgunluk, hafıza bozukluğu, kişilik değişiklikleri, sabah bulantısı, sabah başağrısı, otomatik davranışlar ve depresyon gibi semptomlar eşlik edebilir (14).

## 2.4.2. Tanı

OUAS tanısı için en çok kullanılan teknik altın standart olan bir gecelik polisomnografi'dir (42). Polisomnografi; elektroensefalogram (EEG), elektrookülogram (EOG), elektromyogram (EMG), oronazal hava akımı, göğüs kafesi eforu, vücut pozisyonu, horlama mikrofonu, elektrokardiyografi (EKG) ve oksihemoglobin saturasyonu ölçümlerini içeren en az 12 kanallı kayıt yapabilen bir tanı aracıdır.

Polisomnografi kaydında en az 10 saniye süre ile termal sensörle ölçülen hava akımı sinyalinde % 90'dan fazla azalma apne olarak tanımlanmaktadır. En az 10 saniye süre ile nazal basınç sinyalinin bazale göre en az %30 azalması, bazale göre en az %4'lük desaturasyon ve olay süresinin en az % 90'lık kısmının kabul edilen amplitüd kriterini sağlaması hipopne olarak tanımlanmaktadır. Uyku saati başına düşen apne ve hipopnelerin toplam sayısı Apne-Hipopne İndeksi (AHİ) olarak tanımlanır. AHİ değerlendirmesine göre 5'in altındaki skorlamalar polisomnografik olarak normal kabul edilirken, 5-15 arasındaki skorlar hafif ağırlıkta, 15-30 arasındaki skorlar orta ağırlıkta OUAS, >30 skorlar ağır düzeyde OUAS olarak kabul edilir (24,43).

## 2.5. OUAS'nda Görülen Sistemik Değişikler

### 2.5.1. İnflamasyon

OUAS'nda desaturasyonu izleyen hızlı reoksijenasyonla oluşan tekrarlayan kısa döngülü hipoksinin inflamatuvar süreci tetiklediği düşünülmektedir. Döngüsel hipoksi ile birlikte reoksijenasyon, iskemi-reperfüzyon hasarına benzeyen hasar oluşturmaktadır (44,45). Hipoksi ile iskemik kalan bölgeye tekrar oksijenin gelmesi sonucunda, süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) gibi reaktif oksijen türlerinin üretiminde artış olduğu gösterilmiştir (45). Artmış reaktif oksijen türevleri ve hipoksi transkripsiyon faktörü olan Nükleer Faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)'nin aktivasyonuna yol açmaktadır. NF- $\kappa$ B; Tümör Nekrozis Faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6 gibi birçok proinflamatuvar sitokinin üretimini artırır (46). Özellikle baskın proinflamatuvar sitokin olan TNF- $\alpha$  bazı

vaka-kontrol çalışmalarında kontroller ile karşılaştırıldığında OUAS hastalarında obeziteden bağımsız olarak yüksek bulunmuştur (5). Ayrıca OUAS ile ilgili yapılan bir çok çalışmada nötrofillerin ve monositlerin vasküler endotelyuma adezyon sürecinde anahtar rol oynayan kemokin olan IL-8, monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1), intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve selektin ailesi gibi değişik hücrel adezyon moleküllerinin yükseldiği görülmüştür (47,48).

### **2.5.2. Hematolojik sistem**

Hayvan ve hücre modellerinde kronik döngüsel hipoksiye cevap olarak, oksijen homeostazisinde anahtar faktör olan HIF-1 transkripsiyon faktörünün aktive olduğu gösterilmiştir (49). HIF-1 döngüsel hipoksiye cevap olarak eritropoetin (EPO) sentezini indükler (49). EPO kırmızı kan hücrelerinin üretimini artırarak, kanın oksijen taşıma kapasitesini etkileyen bir hormondur (8). HIF-1 ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) transkripsiyonunu sağlayarak olgun endotelial hücrelerin hipoksik bölgelere migrasyonunu dolayısıyla anjiyogenezi artırır (50). Özellikle ağır gece hipoksemisi olan OUAS hastalarında HIF-1 geninin ürünü olan EPO ve VEGF'nün serum düzeylerinin yükseldiği gözlenmiştir (51,52).

OUAS'lu hastalarda yapılan çalışmalarda prokoagulan moleküller olan; fibrinojen, aktive pıhtılaşma faktörleri olan F7a, F12a ve trombin/antitrombinIII kompleksi, platelet aktivitesi ve fibrinolizi inhibe edici enzim plazminojen aktivatör inhibitör (PAI-1) artmış olarak bulunmuştur. OUAS'nda görülen bu hiperkoagülabilityle ilgili durumun kardiyovasküler hastalıklar için de bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir (53,54,55,56).

### **2.5.3.Kardiyovasküler sistem**

OUAS hastalarında kardiyovasküler hastalık gelişmesinin altında yatan mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, artmış sempatik sistem aktivitesi, endotelial disfonksiyonu, inflamatuvar yolların aktivasyonu ve

metabolik düzenlemenin bozulmasını da içeren multifaktöriyal bir süreç olduğu düşünülmektedir (57).

OUAS hastalarında görülen tekrarlayan uyku bölünmeleri sempatik aktiviteyi artırmaktadır (58). Sistemik sempatik nöral aktivasyonun göstergesi olan plazma ve idrar norepinefrin düzeyleri OUAS hastalarında kontrollere göre yüksek bulunmuştur (59,60). OUAS hastalarında oldukça sık olarak görülen kan basıncı ile ilgili düzensizliklerin artmış sempatik aktiviteyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (61). OUAS'nda kardiyovasküler sistem hastalıklarıyla ilgili öne sürülmüş diğer bir mekanizmada endotelial disfonksiyondur. Endotel tarafından salınan önemli bir vazodilatör madde olan nitrik oksid (NO) seviyelerinin OUAS'lu hastalarda azalmış olduğu görülmüştür (62). Bunun yanında NO salınımından sorumlu olan endotelial NO sentaz (eNOS) antagonisti olan asimetrik dimetilarginin (ADMA) düzeylerinin de OUAS'lu hastalarda artmış olduğunu gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır (63). Endotelden salınan vazokonstriktör etkili bir madde olan endotelinde, OUAS'nda arttığı ve hipertansiyon gelişiminden sorumlu tutulduğu çalışmalar bulunmaktadır (64).

OUAS hastalarında artmış CRP, IL-6 TNF- $\alpha$  ve artmış adezyon moleküllerinin ateroskleroz sürecinin hızlanmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir (5,48,65).

Ayrıca, insülin direnci ve anormal lipid metabolizma özelliği gösteren metabolik sendromun bazı bileşenlerinin OUAS ile bağımsız bir ilişkisi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda bulunan bulgulara göre artmış sempatik aktivitenin visseral yağ hücrelerinden serbest yağ asitlerinin salınmasına neden olarak lipolizi artırdığı, artmış serbest yağ asitlerinin inflamatuvar yolları aktive ettiği ve insülin direncine yol açtığı düşünülmektedir (66).

## **2.6. Demir**

Demir; enerji metabolizması, oksijen taşınması ve solunumu da içeren bir çok hücrel olayda gerekli esansiyel bir elementtir (67). İnsanlarda hemoproteinlerde ve birçok enzimde bulunan non-hem demir içeren proteinlerin yapısında kofaktör olarak fonksiyon yapmaktadır. Oksijen bağlanması ve taşınmasında görevli

hemoglobinler, oksijen metabolizmasındaki görevli katalaz ve peroksidaz gibi enzimler, hücre solunum ve elektron transferinde görevli sitokromlar önemli hemoprotein yapılarıdır. Non-hem demir içeren proteinler; DNA sentezi, hücre solunum ve farklılaşma (ribonükleotid redüktaz), gen düzenlenmesi, ilaç metabolizması ve steroid sentezi gibi temel hücre olaylarında görevlidirler (68).

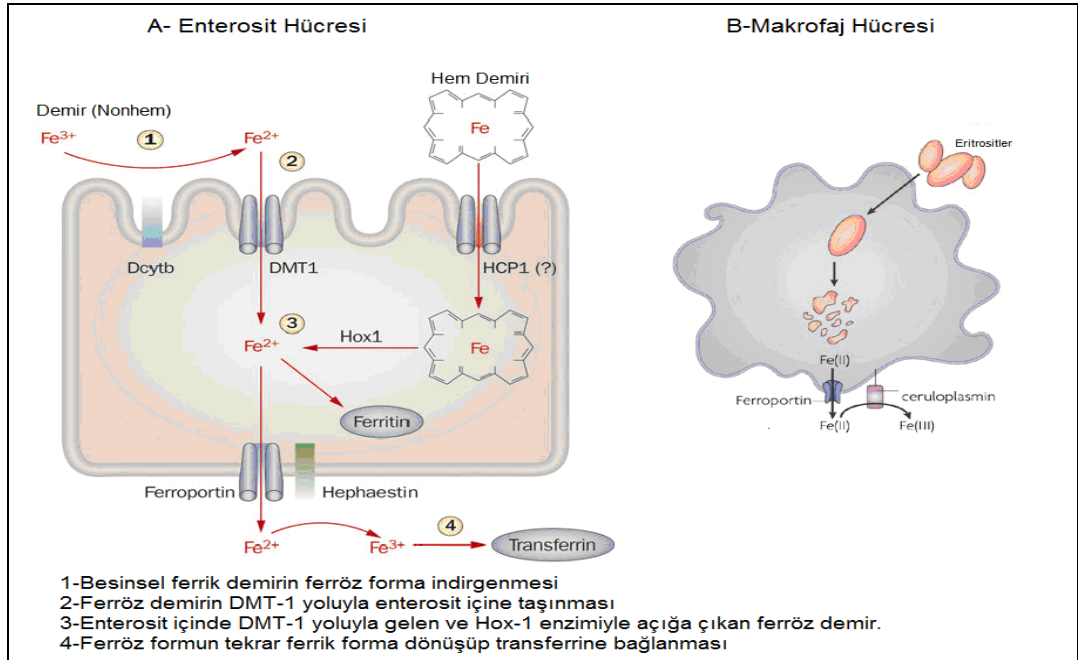
Yetmiş kilogram ağırlığındaki erişkin bir erkek bireyde total vücut demiri yaklaşık 3.5 gr'dır. Demir insan vücudunda ferrik ( $Fe^{+3}$ ) veya ferröz ( $Fe^{+2}$ ) demir olarak iki formda bulunur. Redoks aktivitesi nedeniyle oksidatif reaksiyonlara yol açmamak için insan vücudunda demir iyonları serbest formda tutulmamaktadır. Bu nedenle vücuttaki demirin % 65 kadarı hem şeklinde eritrositlerin hemoglobininde, %10 kadarı myoglobin, enzimlerde ve sitokromlarda, kalan miktarı ise karaciğerde, retikuloendotelial sistem makrofajlarında ve kemik iliğinde bulunur (69). Memelilerin demir atılımı için düzenleyici mekanizması olmadığından, sistemik demir homeostazisi; demir emiliminin, demir geri dönüşümünün ve demir depolarından mobilizasyonun koordineli bir şekilde düzenlenmesiyle sürdürülmektedir (70). Vücuttaki demir gereksiniminin çoğunluğu yaşlı eritrositlerin karaciğer ve dalak makrofajları tarafından parçalanmasıyla açığa çıkan demirin (20-30 mg/gün) geri dönüşümüyle karşılanmaktadır (71).

### **2.6.1. Demir emilimi ve mobilizasyonu**

Normal günlük diyetle alınan demir miktarı 15-20 mg'dır ve bunun 1-2 mg'ı duodenumdan emilir (71). Besinsel demir hem (%10) ve non-hem (iyonik, % 90) olmak üzere iki formda bulunmaktadır (72). Besinsel non-hem demiri esas olarak ferrik formda bulunmaktadır ve emilimden önce ferröz forma indirgenmesi gerekir (73). Duodenal fırçası kenarda eksprese olan duodenal sitokrom b (Dcytb) ferrik demiri ferröz forma indirgeyen bir ferrik redüktazdır (74). Ferröz demirin emilimi enterositlerin apikal membranında bulunan, bilinen tek intestinal demir alıcısı olan divalent metal transporter-1 (DMT-1) yolu ile olmaktadır (75). Hem demirinin absorbe edilmesinin mekanizması ise hala tam olarak aydınlatılamamıştır ancak reseptör aracılı endositoz ile veya hem taşıyıcı protein-1 (hem-carrier protein-1) (HCP1) yolu ile direkt transport olabileceği ileri sürülmektedir. Hem yapısındaki

demir enterositteki hem-oksijenaz-1 (Hox-1) enzimiyle sitozole ferröz formunda salınır (72).  $Fe^{+2}$  hücrede ferritin olarak depolanıp, dökülen enterositlerle birlikte atılmakta ya da ferroportin aracılığı ile basolateral membrandan plazmaya geçmektedir (76) (Şekil 1A). Ferroportin vücuttaki tek demir eksporter proteinidir ve plazma demir konsantrasyonunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. 571 aminoasidden oluşan, 67 kDa ağırlığında bir transmembran proteini olan ferroportinin duodenal mukozada, makrofajlarda, hepatositlerde eksprese olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (77). Enterositte dolaşıma salınan demir transferrine bağlanmadan önce, enterositlerin bazolateral yüzünde eksprese olan bir multibakır oksidaz olan hephaestin tarafından ferröz formu ferrik forma oksitlenmektedir (78). Besinlerle emilen demire ilave olarak makrofajlardan ferroportin yolu ile ferröz demirin ferrik forma seruloplazmin tarafından oksitlenmesiyle de demir dolaşıma girebilir (79) (Şekil 1B).

**Şekil 1:** Demirin barsak hücrelerinden emilimi, barsak hücrelerinden ve makrofajlardan plazmaya geçişi (80,81)



### 2.6.2. Demirin hücrelere taşınması ve alınması

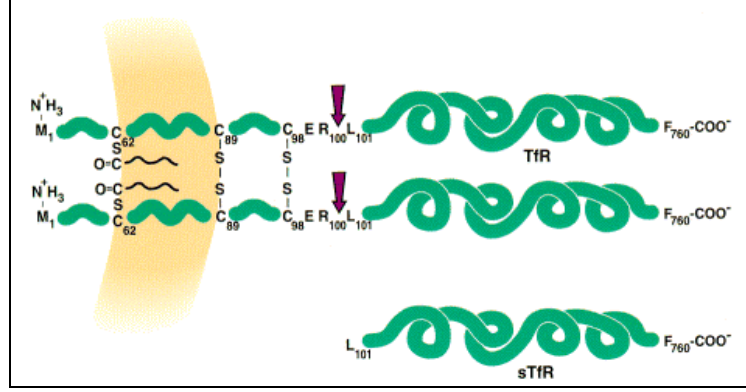
Demir dolaşıma girdiğinde transferrine bağlanır ve çeşitli yerlere kullanım veya depolanma için taşınır. Transferrine bağlanmanın nedeni demiri fizyolojik şartlarda solubl halde tutmak, demir bağımlı serbest radikal oluşumunu önlemek ve demirin hücre içine transferini kolaylaştırmaktır. Transferin başlıca karaciğer tarafından sentezlenen ve salgılanan, 80 kDa ağırlığında, 679 aminoasitten oluşan bir glikoproteindir. N-terminal bölgesi 1-336 no'lu aminoasitlerden, C-terminal bölgesi ise 337-679 no'lu aminoasitlerden oluşmuştur. Her iki bölgede birer demir bağlama bölgesi bulunur ve her bir bölgeye birer adet ferrik demir atomu bağlanmaktadır (82).

Demir bağlı transferin, transferrin reseptörü taşıyan kemik iliği, karaciğer ve immünsistem hücrelerine dağıtılır (9). Transferrin ve transferrin reseptör etkileşiminde, hücre membranının invajinasyonu ile reseptör kompleksini içeren endozom oluşumu gerçekleşir. Endozomun asidifikasyonu konformasyonel değişikliklere neden olarak demirin transferrinden ayrılmasını sağlar (83). Transferrinden ayrılmış demir  $Fe^{+3}$  formunda bulunmaktadır. Endozom membranında bulunan bir metalloredüktaz proteini olan STEAP3 tarafından  $Fe^{+2}$  formuna indirgenir ve endozomdan stoplazmaya DMT1 aracılığıyla taşınır. Tekrarlayan bu siklusun devamı için transferin dolaşıma, transferrin reseptörü ise hücre membranına geri döner (82).

### 2.7. Transferrin reseptörü (TfR)

Transferrin reseptörü (TfR) 760 aminoasitten oluşan ve molekülün ağırlığı 190 kDa olan bir glikoproteindir. Fonksiyonel reseptör, iki disülfid köprüsüyle bağlanmış iki monomerden oluşmaktadır (84). TfR'nin dolaşımdaki formu dokudaki reseptör monomerinin suda çözünebilir (solubl) şeklindedir. Solubl TfR (sTfR), transferrinle kompleks yapmış dokudaki reseptör monomerinin ilk 100 aminoasidini, membranla ilişkili serin proteaz aracılığıyla kaybetmesi sonucunda oluşur (85) (Şekil 2).

**Şekil 2:** Transferrin reseptörü ve solubl transferrin reseptörü.



Hemen hemen tüm hücreler, olgun kırmızı hücreler hariç, yüzeylerinde TfR sahiptirler. Normal bir erişkinde TfR'nin % 80'i eritroid iliktir. Serumda ölçülen sTfR kütlesi hücresel TfR miktarı ile orantılıdır ve çoğunlukla eritroblastlardan ve daha az olarak retikülositlerden kaynaklanmaktadır (85).

Çoğalan hücrelerdeki reseptör yoğunluğu, demirin kullanılabilirliği ile ilişkilidir. Demir ihtiyacı olduğunda TfR sentezi indüksiyonu görülürken, aşırı demir olduğunda ise TfR sentezi baskılanmaktadır. Eritropoezde artmış demir ihtiyacının temini için eritroid öncüllerde transferrin reseptörü yüksek oranda eksprese olur (86). Hipertransfüzyon, kronik renal yetmezlik, ağır aplastik anemi veya yoğun kemoterapi sonrası gibi eritroid hipoplazi ile karakterize durumlarda azalmış sTfR düzeyleri görülmektedir (87). Konjenital diseritropoetik anemi, hemolitik anemi, herediter sferositoz, orak hücre anemi, talasemi majör veya intermedia, megaloblastik anemi veya sekonder polisitemi gibi eritropoezin uyarıldığı durumlarda artmış sTfR düzeyleri görülmektedir (88).

## 2.8. Ferritin

$Fe^{+2}$  hücre içine girdiğinde, ferritine bağlanarak depolanmaktadır ve serum ferritini demir depolarının bir göstergesidir.

Ferritin; H (heavy veya heart) ve L (light veya liver) olmak üzere başlıca iki alt ünitesi olan 24 protein alt biriminden oluşan en az 440 kDa ağırlığında bir heteropolimerdir. L alt birimi 19.7 kDa ağırlığında ve 174 aminoasitten, H alt birimi ise 21 kDa ağırlığında olup 182 aminoasitten oluşmuştur. Alt birimler merkezde bir



boşluk bırakarak küresel ferritin molekülünü oluştururlar. Bu boşlukta yaklaşık 4500 adet kristal demir atomu poli-demir-fosfat oksid formunda depolanmaktadır. Ferritin molekülü üzerinde hidrofilik aminoasitlerle kaplı 8 adet kanal, hidrofobik aminoasitler ile kaplı 6 adet kanal bulunmaktadır. Hidrofilik kanallar serin, histidin ve sistein kalıntıları ile kaplı ve aspartik asit ve glutamik asit ile sonlanmaktadır. Bu aminoasitlerin yüksek oranda metal ligand bağlama yetenekleri bulunmaktadır. Bu kanallar sayesinde demirin ferritin kabuğundan içeri veya dışarı hareket ettiği düşünülmektedir (89).

Serum ferritin düzeyleri demir eksikliği anemisi ve flebotomide belirgin olarak azalır. Aşırı demir yüklenmesi ve hemakromatoz durumlarında artmaktadır (90,91). Ferritin ayrıca akut ve kronik inflamasyon durumlarında da artmaktadır. Bu artış CRP,  $\alpha_1$ -asid glikoprotein gibi diğer akut faz reaktanlarıyla koreledir. Bu özelliğinden dolayı ferritin inflamasyon belirteci olarak kullanılabilir (92,93).

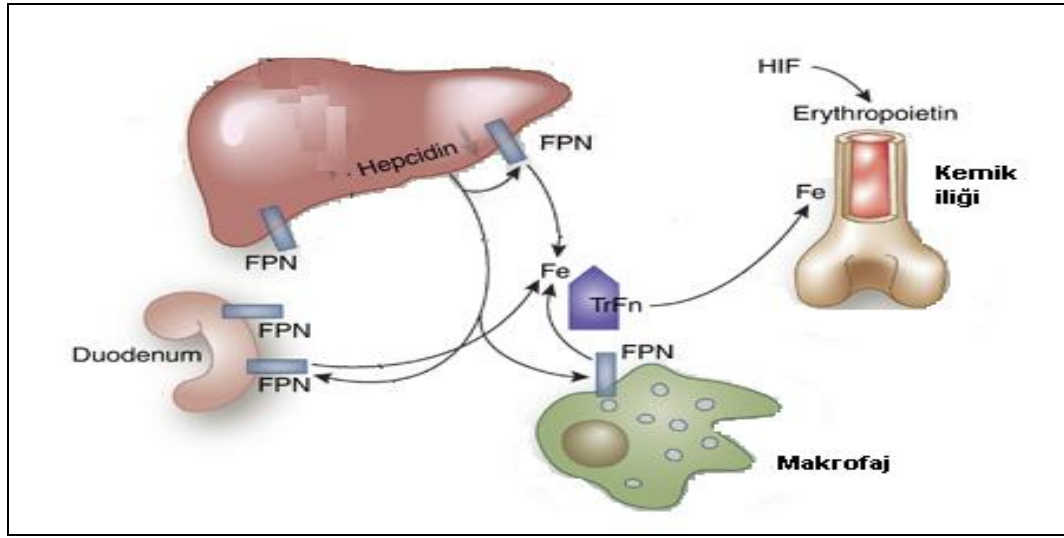
## 2.9. Hepsidin

Hepsidin bir antimikrobiyal peptid olarak ilk defa 2000 yılında tanımlanmıştır (94). Karaciğer kaynaklı olması ve in vitro bakterisidal etkileri nedeniyle hepsidin (hepatik bakterisidal protein) olarak adlandırılmıştır (95). İnsan hepsidin geni (HAMP) kromozom 19q13.1'de lokalizedir (96). Hepsidin 84 aminoasitten oluşan preprohepsidin olarak sentezlenir. C-terminalindeki pre yapısının enzimatik parçalanmasıyla 64 aminoasit uzunluğunda prohepsidin peptidi meydana gelir. Prohepsidin endoplazmik retikulum lümeninden sitoplazmaya salındıktan sonra, Pro bölgesindeki 39 aminoasidi kaybeder ve 25 aminoasitten oluşan 27 kDa ağırlığındaki aktif hepsidin formu açığa çıkar. Aktif formdaki hepsidin peptidinde sistein molekülleri arasında 4 adet disülfid köprüsü bulunur (97). Hepsidin aktivitesi için N-terminal aminoasitlerinin esansiyel olduğu, N-terminaldeki ilk 9 aminoasitten oluşan "minihepsidin" formunun biyoaktivite için yeterli olduğu gösterilmiştir (98).

Hepsidin demir düzenleyici hormon olarak bilinir ve majör fonksiyonu dokulardan demiri ayırmak, serum demir seviyelerini düşürmek ve besinlerden demir emilimini azaltmaktır. Hepsidin demir homeostazisini ferroportin down regülasyonu ile düzenlemektedir (99). Hepsidin ferroporinin hücre dışındaki

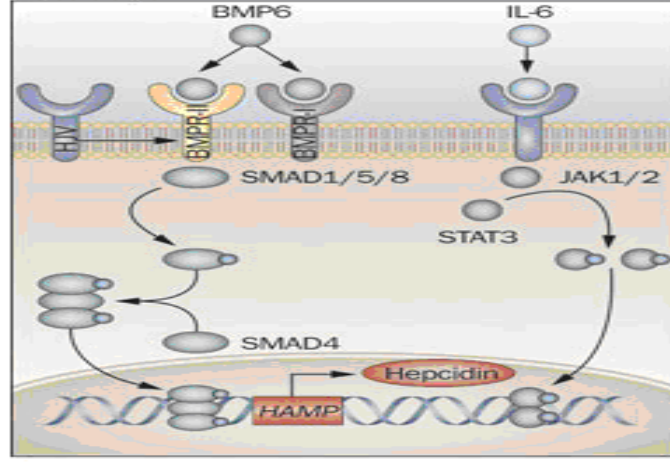
yüzüne bağlanmasıyla, hücre içinde janus kinaz-2 aktive olmaktadır bu da ferroportinin internalizasyonu, ubiquitinasyonu ve degradasyonu ile sonuçlanmaktadır (100). Hepsidin ile indüklenmiş ferroportinin internalizasyonu, duodenal enterositlerden, makrofajlardan ve hepatositlerden dolaşıma azalmış demir akışıyla sonuçlanmaktadır (99) (Şekil 3).

**Şekil 3:** Hepsidin etkileri (101)



Hepsidin ekspresyonu başlıca BMP sinyal yoluyla transkripsiyonel düzeyde kontrol edilmektedir (102). BMP6 bu süreçte önemli rol oynar (103). Artmış serum demir konsantrasyonu ile uyarılan BMP reseptörü 1 ve BMP koreseptörü olan hemojüvelin tarafından başlatılan SMAD 1/5/8 transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu ile nükleusta hepsidin sentezi artırılır (102). Hepsidin sentezi ayrıca inflamasyon ve enfeksiyon tarafından da artırılmaktadır. İnflamatuvar süreçte aktive makrofajlardan salınan IL-6, IL-6 reseptörüne bağlanarak Janus kinaz (JAK)/STAT-3 sinyal yolunu aktive ederek, hepsidin sentezini artırmaktadır (104) (Şekil 4).

**Şekil 4:** Hepsidin sentezi sinyal yolları (105)



## 2.10. Hemojuvelin

Hemojuvelin “Repulsive Guidance Molekül (RGM)” ailesinin bir üyesidir ve RGMc olarak bilinir (106). Hemojuvelin 1q21 kromozomunda lokalize olan HFE2 geni tarafından kodlanmaktadır (107). HFE2 iskelet kası, kalp ve karaciğerde yüksek miktarda eksprese edilir (106).

Hemojuvelinin hepsidin üretiminin düzenlenmesinde ve demir homeostazisinde esansiyel olduğu gösterilmiştir (108,109). HFE2 genindeki homozigot veya birleşik heterozigot mutasyonlar herediter hemakromatozislerin en ağır formu olan juvenil hemakromatoza sebep olmaktadır. Hemojuvelin mutasyonları yoluyla juvenil hemakromatozlu hastalarda çok düşük hepsidin seviyeleri saptanmıştır. Hemojuvelin mutasyonlu juvenil hemokromatoz hastalarında özellikle; karaciğer, kalp ve pankreasta ağır demir birikimiyle sonuçlanan hepatik hepsidin ekspresyonunda belirgin baskılanma görülmektedir (106).

Hemojuvelin membrana bağlı ve solubl form olmak üzere iki şekilde bulunur. Membrana bağlı hemojuvelin, bone morphogenetic proteinlerin (BMPs) koreseptörüdür ve BMP/SMAD sinyal yolağı üzerinden hepsidin sentezini sağlar (102,110). Hücre yüzeyinde BMP ligandının BMP reseptörüne bağlanmasıyla oluşan ligand-reseptör kompleksi, sitoplazmadaki SMAD1, SMAD5 ve SMAD8 fosforilasyonunu başlatan reseptörü aktive etmektedir. Fosforile SMAD (pSMAD)

şekli, SMAD4 ile heteromerik kompleks yaparak, hedef genlerin transkripsiyonunu indükleyeceği nükleusa taşınır (111). BMP 6 endojen hepsidin üretiminin pimer indükleyicisi olarak bilinmektedir (112).

Membrana bağlı hemojuvelin proteinin proteolitik yıkılımı ile birçok izoform yapısı meydana gelir. Matriptaz-2 ve furin proteazlarıyla membrana bağlı hemojuvelin parçalanır ve solubl ekstrasellüler hemojuvelin yapısı açığa çıkar (113). Membrana bağlı hemojuvelin BMP-SMAD sinyalizasyonunu stimüle ederken, soluble hemojuvelin BMP-SMAD sinyalizasyonunu inhibe eder (114).

## 2.11. İnterlökin (IL-6)

IL-6, sinir sistemi ve hematopoetik sistemin gelişimi, akut-faz cevabı, inflamasyon, immün yanıt oluşumu ve onkogenezi kapsayan birçok biyolojik süreci düzenleyen bir pleiotropik sitokindir (115,116).

IL-6 73. ve 172. aminoasitlerinden glikozillenmiş 185 aminoasitten oluşan tek polipeptid zinciridir ve 4 $\alpha$ -heliksten oluşan bir demet şeklindedir (117,118). Fizyolojik şartlarda immün sistem hücreleri (T hücreleri, B hücreleri, monositler), vasküler endotel hücreleri ve adipositler IL-6'nın ana kaynağıdır (119,120). Monositler, glikozilasyon ve fosforilasyon gibi posttranslasyonel değişikliklerle moleküler ağırlığı 21.5-28 kDa arasında değişen en az 5 değişik IL-6 molekül formu sentezlemektedir (121). IL-6 fibroblastlar, epidermal keratinositler, endotelial hücreler, sinsityotrofoblastlar, mezengiyal hücreler ve bazı tümör hücreleri (plazmasitoma, multipl myelom ve renal hücreli karsinom) gibi lenfoid ve lenfoid olmayan bir çok hücre tipinden de üretilmektedir (115).

IL-6 sentezi için fizyolojik uyarılar; bakteriyel endotoksinler, IL-1, TNF- $\alpha$ , platelet-derive büyüme faktörü (PDGF) ve oncostatin M'dir (122). IL-6, IL-6 reseptörü ile yüksek affiniteli kompleks oluşturarak etkisini gösterir (123). IL-6 reseptörü, IL-6'yı spesifik olarak tanıyan 80 kDa ağırlığında reseptör alt ünitesi olan IL-6r ve IL-6 ailesi için sinyalizasyon reseptör molekülü olan 130 kDa ağırlığında sinyal iletilici birim olan gp130'dan oluşmaktadır. IL-6 ile IL-6r'nin bağlanması gp130'un homodimerizasyonu izler ve iki farklı sinyal yolunu aktive eder. Gp130 ile ilişkili JAK/STAT (Janus protein kinaz/ sinyal iletilici ve transkripsiyon aktive

ediciler) ve tirozin fosfataz içeren Src homology 2 (SHP-2)/hücre dışı signal-regulated kinaz (ERK)/Mitogen-activated protein kinaz (MAPK) yolunu tetikleyerek gen ekspresyonuna yol açarlar (124,125,126).

Akut inflamasyonda IL-6, T hücrelerinin gelişmesini ve aktivasyonunu ve B hücrelerinin farklılaşmasını desteklemektedir. Ayrıca hepatositlerden pozitif (C-reaktif protein (CRP), fibrinojen,  $\alpha$ 1- antitripsin ve serum amiloid A) ve negatif (albumin) akut faz reaktanlarının sentezini düzenlemektedir (127,128). Ateş, hipotalamo-hipofizer-adrenal aksın aktivasyonu, anoreksi ve letarji gibi akut inflamasyonun diğer tipik manifestasyonları IL-6 tarafından indüklenmektedir (129). Kronik inflamasyon hastalığı ve kanser durumlarında oldukça sık gözlemlenen bir durum olan kaşeksi ve kas kütlesi kaybı sürecinde IL-6 çok önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca endojen kortikosteroid salgısını artırarak adipoz doku kaybına aracılık etmektedir (130,131,132).

IL-6 plazmada, proteazların etkilerinden koruyan ve bir taşıyıcı protein olarak fonksiyon yapan  $\alpha$ -2-makroglobulin ile 42-45 kDa ağırlığında bir kompleks oluşturmaktadır (133). İnsanlarda serum IL-6 konsantrasyonu 24 saatlik periyotta saat 19.00 ve saat 5.00'te olmak üzere bifazik varyasyon göstermektedir (134).

## 2.12. CRP

İlk olarak pnömonili hastaların serumunda tespit edilen, pneumococcal C-polisakaridi ile presipitasyon meydana getirmesinden dolayı CRP olarak isimlendirilen bir akut faz reaktanıdır (135). CRP; kalsiyum bağımlı ligand bağlayan plazma proteinlerinden pentaksin ailesinin bir üyesidir (136). 1. Kromozomda yerleşmiş sadece bir tek gen tarafından kodlanmaktadır (137). İnsan CRP molekülü (115 kDa), birbirine özdeş 5 adet glikozile olmayan polipeptid alt ünitelerinin birleşmesinden oluşmuştur. Her bir polipeptid alt ünitesi 206 aminoasit kalıntısı içermektedir. Bu beş protomer kovalent olmayan bağlarla halkasal biçimde bağlanarak siklik pentamerik simetri oluşturmaktadır. Her bir protomer iki katlı  $\beta$  tabakadan oluşan karakteristik lektin kıvrımı içermektedir. Ligand bağlayan bu bölge iki kalsiyum iyonunun bağlandığı spirallerden oluşmuştur ve konkav yüzde yerleşmiştir. Diğer yüzde bir tek  $\alpha$  heliks bulunmaktadır (138,139).  $\alpha$  heliks yüzü ile

CRP immün sistem ile etkileşime girmektedir. Kompleman sisteminin ilk bileşeni olan C1q'ya bağlanır ve klasik kompleman yolunu aktive etmektedir(140). Ayrıca fagositik hücrelerin fcγ reseptörüne de bağlanmaktadır (141).

CRP inflamasyon, enfeksiyon ve doku hasarının yüksek duyarlılıktaki bir belirteçidir. CRP doğal immün sistemin bir parçasıdır ve doku hasarına cevap olarak sentezi indüklenmektedir (140). CRP'nin ölmüş ve ölmekte olan hücrelerin membran fosfolipitlerinin ve nükleer bileşenlerinin temizlenmesinde önemli bir çöpçü rolü oynadığına inanılmaktadır (142). CRP; hepatositler ve vasküler endotelyum tarafından sentezlenmektedir ve ekspresyonu özellikle IL-6 ve daha az oranda olmak üzere TNF-α ve IL-1 tarafından düzenlenmektedir. CRP düzeyleri inflamatuvar uyarılara cevap olarak hızlıca yükselmektedir ve inflamatuvar uyarı ortadan kaldırıldığında CRP düzeyleri hızlıca normal düzeylerine geri dönmektedir. CRP sentezi inflamatuvar uyarıdan 6 saat sonra başlamaktadır ve 24 ile 72 saatte pik yapmaktadır. Plazmadaki yarı ömrü oldukça stabildir ve yaklaşık olarak 19 saattir. IL-6 uyarısı sona erdiğinde ortalama 7 günde normal değerlerine geri dönmektedir (143). İnsanlarda CRP'nin bazal düzeyleri 5 µg/ml'den daha düşüktür ve akut faz sırasında 500 µg/ml düzeylerine kadar çıkabilmektedir (144). Poliklonal antikor kullanan CRP yöntemlerinin deteksiyon limiti 3 mg/L'dir. Subklinik kronik inflamasyon durumlarındaki CRP değişikliklerini saptamak için daha sensitif olan spesifik antikora lateks partikülünün kovalent olarak bağlanmasıyla karakterize high sensitif CRP (hsCRP) metodu geliştirilmiştir (145).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hasta Grubu

Tez çalışması ile ilgili olarak, Bülent Ecevit Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 28/03/2012 tarih 2012/07/02 sayılı kararı ile çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna dair onay alındı (Ek 1).

Bu çalışmaya Nisan 2012 ile Nisan 2013 tarihleri arasında Bülent Ecevit Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalının Uyku Bozuklukları Merkezine başvuran, 34-72 yaş aralığında, polisomnografi sonucunda Apne-Hipopne İndeksi >5 bulunan 25 erkek ve 12 kadın toplam 37 erişkin hasta çalışmaya dahil edildi. Hipertansiyon, diyabet, hiperlipidemi, anemi, koroner arter hastalığı, sistemik enflamatuvar hastalıklar ve kanser gibi kronik hastalığı bulunan bireyler çalışmamıza dahil edilmedi. Kontrol grubu olarak sistematik hastalığı olmayan sigara içmeyen sağlıklı 35-63 yaş aralığında 25 erkek ve 11 kadın toplam 36 birey çalışmaya dahil edildi. Tüm hastaların ve kontrol grubunun vücut kitle indeksleri kaydedildi.

Kriterlere uygun hastalar ve sağlıklı bireyler araştırma hakkında bilgilendirildi ve 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nun okutulup, onay alınmasının ardından çalışmaya dahil edildi.

#### 3.2. Örneklerin Toplanması

OUAS tanısı almış hastalardan serum demir, TDBK, ferritin, IL-6, hsCRP, hepsidin, hemojuvelin ve sTfR düzeylerinin ölçümü için kanlar her hastadan 2'şer adet 10 ml'lik jelli, seperatör içeren vakumlu tüplere (Vacuette, Greiner, Avusturya) alındı. Kanların pıhtılaşması beklendikten sonra 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan serum örnekleri ölçüm için -40 °C'de analiz edilene kadar saklandı. Laboratuar çalışmaları Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuarında yapıldı.

### 3.3. Ölçümler Sırasında Kullanılan Cihazlar

- 1.Otoanalizör: Mindray BS-2000M (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., LTD., Mindray Building, Keji 12th Road South, Hi-Tech Industrial Park, Nanshan, Shenzhen, 518057, P.R. CHİNA)
- 2.Hormon Cihazı: UniCel DxI 600 Access Immunoassay system (Beckman Coulter Inc., Kraemer Blvd., Brea, CA, 92821, USA)
- 3.Mikroplak Okuyucu: ELX800G (BİO-TEC Instruments, Winooski, USA)
- 4.Mikroplak Yıkama Cihazı: ELX 50/8 (BİO-TEC Instruments, Winooski, USA)
5. Plak Çalkalayıcı: Easy shaker EAS 2/4 (SLT Lab Instruments, Grödig, AUSTRIA)
- 6.-40 °C Derin dondurucu: Sanyo Biomedical Freezer (-40 °C) (Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., JAPAN)
- 7.Vorteks: ZX3 (Velp Scientifica, Milan, İtalya)
- 8.Cam ve otomatik pipetler (Eppendorf, Hamburg, Almanya)
- 9.Santrifüj (Jouan Saint, Herblain, Fransa)
- 10.Dispensör (0.05-50 ml)
- 11.Pipet ve dispensör uçları
- 12.Ependorf tüpleri
- 13.Mezür (100 ml)

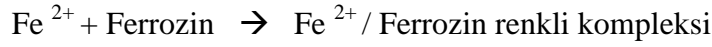
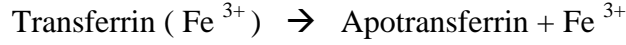
### 3.4. Test Ölçümleri

#### 3.4.1. Serum demir ölçümü

Serum demir düzeylerinin kantitatif ölçümü end point kolorimetrik test yöntemine dayanan Iron (Fe) (Shenzhen Mindray Bio-Electronics, Hamburg, GERMANY) kiti kullanılarak yapıldı.

**Testin prensibi:** Ferrik demir asidik ortamda taşıyıcı proteini olan transferrinden ayrılır. Transferrinden salınmış ferrik iyonları askorbik asit yardımı ile ferröz formuna indirgenir. Daha sonra ferröz demire hassas bir demir indikatörü olan ferrozin ile renkli kompleks oluşturur. Reaksiyon denklemi aşağıda gösterilmiştir.





Renk yoğunluğu direkt olarak demir konsantrasyonu ile orantılıdır. 570 nm’de fotometrik olarak ölçülür.

Kalibratör Hazırlanması: Reaktifin kendine ait kullanıma hazır, konsantrasyon değeri 190.4 µg/dl olan kalibratörü kullanıldı.

Kontrol hazırlanması: Normal ve patolojik düzey kontrol numuneleri 5 ml distile su ile çözülüp, yavaşça çalkalandı ve 30 dk. oda ısısında bekletildi.

Normal seviye kontrol: 86.8-130.5 µg/dl

Patolojik seviye kontrol: 202.2-304.1 µg/dl

Seum demir çalışma prosedürü Tablo 1’de gösterilmiştir.

**Tablo 1:** Serum demiri çalışma prosedürü

	Kör	Numune	Kalibratör
Reaktif 1	250 µl	250 µl	250
Distile Su	20 µl	-	-
Numune	-	20 µl	
Kalibratör	-	-	20 µl
37 °C’de 5-10 dk. inkübasyon ve numunelerin, kalibratörün ve reaktif körünün absorbansları okunur.			
Reaktif 2	50 µl	50 µl	50 µl
1-2 dk. sonra 37 °C’de numunelerin, kalibratörün ve reaktif körünün absorbansları tekrar okunur.			
$\Delta A_N = [\Delta A \text{ numune}] - [\Delta A \text{ kör}]$			
$\Delta A_K = [\Delta A \text{ kalibratör}] - [\Delta A \text{ kör}]$			

Hesaplama denklemi aşağıda gösterilmiştir.

Numune konsantrasyonu =  $(\Delta A_N / \Delta A_K) \times$  Kalibratör konsantrasyonu

Üretici firma tarafından tespit edilmiş deteksiyon limiti 5.04 µg/dl olup, ölçüm için kesinlik göstergesi olan gün içi CV % 0.91 ve günler arası CV % 0.55’dir. Üretici firma tarafından sağlıklı kişiler için referans aralığı erkekler için 45-158 µg/dl, kadınlar için 37-145 µg/dl’dir.

### 3.4.2. Unsature demir bağlama kapasitesinin (UDBK) ölçümü

UDBK düzeyinin kantitatif ölçümü end point kolorimetrik test yöntemine dayanan UIBC Liquid (Sentinel Diagnostics, Milano ITALY) kiti kullanılarak yapıldı.

**Testin prensibi:** Serum örneğindeki transferrinin demir bağlamaya elverişli olan bölgelerini doyurmak için, serum örneği, alkali tampon ve içerdiği demir konsantrasyonu bilinen indirgeyici solüsyona eklenir. Transferrinin doyurulmasından sonra serum örneğindeki transferrine bağlı olmayan demir ferröz forma indirgenir ve renk yoğunluğu 580-600 nm'de ölçülen frene-S ile stabil kompleks oluşturur. Böylece UDBK eklenen total demir miktarından serbest demir miktarı çıkarılarak hesaplanır.

**Kalibratör Hazırlanması:** Reaktifin kendine ait kullanıma hazır konsantrasyon değeri 500 µg/dl olan kalibratörü kullanıldı.

**Kontrol Hazırlanması:** Normal düzey kontrol numuneleri 5 ml distile su ile çözülüp, yavaşça çalkalandı ve 30 dk. oda ısısında bekletildi. (Normal seviye kontrol: 157±31 µg/dl )

UDBK çalışma prosedürü Tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2:** Unsature demir bağlama kapasitesi (UDBK) çalışma prosedürü

	Reaktif körü	Numune	Kalibratör
Distile Su	0.2 ml	-	0.1 ml
Numune	-	0.1 ml	-
Standart	-	0.1 ml	0.1 ml
Reaktif 1	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
37 °C'de 5 dk. inkübasyon. Numunelerin absorbanları (ABS) reaktif körüne karşı okunur.			
Reaktif 2	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
37 °C'de 5 dk. inkübasyon. Numunelerin (AS) ve kalibratörün (AST) absorbanları reaktif körüne karşı okunur. Son renk en az 1 saat stabildir.			

Hesaplama denklemi aşağıda gösterilmiştir.

$$UDBK (\mu\text{g/dl}) = 500 - \{ 500 \times [(AS - ABS)/AST] \}$$

$$TDBK = UDBK + \text{Serum demir konsantrasyonu}$$

Üretici firma tarafından tespit edilmiş deteksiyon limiti 9 µg/dl olup, ölçüm için kesinlik göstergesi olan gün içi CV %1.93-4.25 ve günler arası CV %4.91-6.48'dir. Üretici firma tarafından sağlıklı kişiler için referans aralığı 110-370 µg/dl'dir.

### 3.4.3. Ferritin ölçümü

Ferritin düzeyinin kantitatif ölçümü iki bölgeli immünoenzimatik ("sandviç") test prensibine dayanan Ferritin (Beckman Coulter, Galway, IRELAND) kiti kullanılarak yapıldı.

**Testin prensibi:** Keçi anti ferritin alkalın fosfataz konjugatı ile fare monoklonal anti-ferritin kompleksleri kaplı paramanyetik partiküller içeren reaksiyon kabına bir örnek alınır. Serum veya plazma (heparin) ferritini katı faz üzerinde immobilize monoklonal anti ferritine bağlanırken, keçi anti ferritin enzim konjugatı ferritin moleküllerindeki farklı antijen bölgeleriyle reaksiyona girer. Bir reaksiyon kabındaki inkübasyonun ardından, maddeler katı faza bağlanır ve bağlanmamış maddeler yıkanırken, manyetik bir alanda tutulur. Daha sonra kemilüminesans substrat Lumi-Phos 530 kaba eklenir ve reaksiyonun oluşturduğu ışık bir luminometre kullanılarak ölçülür. Işık üretimi örnekteki ferritin konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. Örnekteki analit miktarı, çok noktalı bir kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Standart Hazırlanması: Kalibratör olarak Access Ferritin kalibratör seti kullanıldı. Kalibratörler 4 ml'lik şişelerde kullanıma hazır. Kalibratör konsantrasyonları;  $S_0=0$  ng/ml,  $S_1=0$  ng/ml,  $S_2=50$  ng/ml,  $S_3=200$  ng/ml,  $S_4=500$  ng/ml ve  $S_5=1500$  ng/ml seviyelerinde insan karaciğer ferritini kullanıldı. Kantitatif test kalibrasyonu, analit konsantrasyonları bilinen kalibratörler hasta örneği gibi test edildi. Ölçülen yanıtlar ve bilinen analit konsantrasyonları arasındaki matematiksel ilişki kalibrasyon eğrisini oluşturur. Bu kalibrasyon eğrisi, hasta örneklerinin RLU (Bağlı Işık Birimi) ölçümlerini belirli kantitatif analit konsantrasyonlarına dönüştürmek için kullanılır.

Kontrol Hazırlanması: Ferritin kontrolü olarak BİO-RAD marka Lyphocheck Immunoassay Plus Control seviye 1 ve 2 kullanıldı. Kontroller 5 ml distile su ile çözülüp yarım saat iyice çözünmesi beklendi.

Kontrol Seviye 1:49.3±2.63 ng/ml

Kontrol Seviye 2:93.8±5.03 ng/ml

Üretici firma tarafından tespit edilmiş deteksiyon limiti 0.2 ng/ml olup, ölçüm için kesinlik göstergesi olan gün içi CV % 2.6-3.9 ve günler arası CV % 4.1-6.3'dür.

Üretici firma tarafından sağlıklı kişiler için referans aralığı erkekler için 23.9-336.2 ng/ml, kadınlar için 11.0-306.8 ng/ml'dir.

#### **3.4.4. Solubl transferrin reseptör ölçümü**

İnsan sTfR düzeyinin kantitatif ölçümü sandviç ELİSA prensibine dayanan human sTfR (BioVender-Laboratori, Brno, Czech Republic) kiti kullanılarak yapıldı.

**Testin Prensi:** Analizde kullanılan mikrokuyucukların duvarları sTfR'ye karşı geliştirilmiş antikorlarla kaplanmıştır. İlk inkübasyon sırasında dilüe standartlar, dilüe kontroller, dilüe örnekler ile dilüsyon tamponu (kör) kuyucuklara pipetlenir. Plak çalkalayıcıda ve oda ısısında 60 dakika inkübasyondan sonra yıkama yapılır. Daha sonra ortama horseradish peroksidaz (HRP) enzimi eklenir. Plak çalkalayıcıda ve oda ısısında 60 dakika inkübe edilir. Bu enzimin bağlanması ile sandviç kompleksi oluşmaktadır. İnkübasyondan sonra yıkama yapılır ve bağlanmayan enzimler ortamdan uzaklaştırılır. Sonrasında ortama substrat solüsyonu eklenerek reaksiyon başlatılır ve renk değişimi meydana gelir. 10 dakika inkübasyon sonrasında stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılır. Daha sonra renklenmiş ürünlerin absorbansı 450 nanometrede okutulur. Oluşan renk yoğunluğunun absorbansı sTfR konsantrasyonları ile orantılıdır.

Kullanılan kitin içeriği:

- Human sTfR antikorları ile kaplanmış plak (8x12=96 kuyucuk)
- Standart seti
- Dilüsyon tamponu
- Konjugat solüsyonu
- Substrat solüsyonu

- Stop solüsyonu
- Yıkama solüsyonu

Standartların Hazırlanması: Her bir standart konsantre likid olarak 0.1 ml'ydi. Analize başlamadan hemen önce her bir standart dilüsyon tamponu ile 1:10 oranında (ör: 30 µl standart + 270 µl dilüsyon tamponu) dilüe edildi. Dilüe edilen standartlar vorteks kullanılarak köpük oluşturulmadan iyice karıştırıldı. Standartların konsantrasyonları sırasıyla 0.05 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0.2 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml'ydi.

Kontrollerin (düşük ve yüksek seviye) Hazırlanması: Kontroller konsantre likid olarak 0.05 ml'ydi. Analize başlamadan hemen önce her bir kontrol dilüsyon tamponu ile 1:50 oranında (5 µl kontrol + 245 µl dilüsyon tamponu) dilüe edildi. Dilüe kontroller vorteks kullanılarak köpük oluşturulmadan iyice karıştırıldı. Kontrollerin konsantrasyonları sırasıyla 1.3-2.0 ve 5.5-8.3 µg/ml'ydi.

Numunelerin Hazırlanması: Numuneler dilüsyon tamponu ile 1:50 oranında (5 µl numune + 245 µl dilüsyon tamponu) dilüe edildi. Dilüe edilen numuneler vorteks kullanılarak köpük oluşturulmadan iyice karıştırıldı.

Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması: 10 kat konsantre yıkama çözeltisi distile su kullanılarak dilüe edildi (100 ml 10 kat konsantre yıkama solüsyonu + 900 ml distile su).

sTfR çalışma prosedürü Tablo 3'de gösterilmiştir.

**Tablo 3:** sTfR çalışma prosedürü

	Kör	Standart	Kontrol	Numune
Kör Dilüsyon (Tamponu)	100 µl	-	-	-
Standart (1-6)	-	100 µl	-	-
Kontrol	-	-	100 µl	-
Numune	-	-	-	100 µl
25-30 °C'de plak çalkalayıcıda 300 rpm'de 1 saat inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 350 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama				
Konjugat	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
25-30 °C'de plak çalkalayıcıda 300 rpm'de 1 saat inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 350 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama				
Substrat	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyon (karanlıkta)				
Stop	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

ELİSA okuyucu cihazda 450 nanometrede absorbanslar alındı. Her kuyucuğun absorbansından zero kuyucuğunun absorbansı çıkarılarak relatif absorbanslar hesaplandı. Standart solüsyonlarının da relatif absorbansları hesaplanarak oluşturulan standart eğrisi yardımıyla numune konsantrasyonları bulundu. Sonuçlar dilüsyon faktörü olan 5 ile çarpılarak hesaplandı.

Üretici firma tarafından tespit edilmiş deteksiyon limit 2 ng/ml olup, ölçüm için kesinlik göstergesi olan gün içi CV % 6.0-7.5 ve günler arası CV % 5.5-7.0'dır.

Referans Aralığı: Üretici firma tarafından 153 kişinin serumu (84 erkek + 69 kadın, 20-65 yaş, Kafkas popülasyonunda) ölçüldüğünde, 0.075 ile 1.699 µg/ml (ortalama 0.868 µg/ml) arası değerler elde edilmiştir.

### 3.4.5. Hepsidin ölçümü

Serum hepsidin düzeyinin ölçümü yarışmalı solid faz sandviç ELİSA prensibine dayanan Hepsidin-25 (bioactive) (DRG Diagnostics, Marburg, GERMANY) kiti kullanılarak yapıldı.

**Testin Prensipleri:** Analizde kullanılan mikrokuyucukların duvarları hepsidine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlarla kaplıdır. İlk inkübasyon sırasında hepsidin standartları ve kontrolleri ile örnekler kuyucuklara pipetlenir. Sonrasında ortama biyotin ile işaretli hepsidin eklenir. Oda ısısında, plak çalkalayıcıda 60 dakika inkübe edilir. İnkübasyondan sonra yıkama yapılır. Daha sonra streptavidin-peroksidaz enzimi ortama eklenir ve oda ısısında 30 dakika inkübe edilir. Bu enzimin biyotinize hepsidine bağlanması ile sandviç kompleksi oluşur. İnkübasyon sonunda tekrar yıkama yapıp bağlanmayan enzimler ortamdaki uzaklaştırılır. Sonrasında ortama substrat solüsyonu eklenerek reaksiyon başlatılır ve reaksiyonda renk değişimi meydana gelir. Oda ısısında 20 dakika inkübasyon sonrasında stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılır. Daha sonra renklenmiş ürünlerin absorbansı 450 nanometrede okutulur. Hepsidin konsantrasyonu oluşan renk yoğunluğu ile ters orantılıdır.

Kit İçeriği:

- Anti-hepsidin-25 antikorları ile kaplanmış plak (8x12=96 kuyucuk)
- Standart seti (standart 0-5)
- Kontrol (düşük ve yüksek seviye)
- Assay tampon
- Enzim konjugat
- Enzim kompleks
- Substrat solüsyonu
- Yıkama solüsyonu

Standartların Hazırlanması: Liyofilize standartlar 0.2 ml distile su ile çözülüp, yavaşça çalkalandı. 10 dakika çözülmesi beklendi. Standartların konsantrasyonları sırasıyla 0 ng/ml, 2 ng/ml, 6.5 ng/ml, 25 ng/ml, 45 ng/ml, 80 ng/ml'yd.

Kontrollerin Hazırlanması: Normal ve yüksek düzey liyofilize kontroller 0.2 ml distile su ile çözülüp yavaşça çalkalandı. 10 dakika çözülmesi beklendi. Kontrollerin konsantrasyonları sırasıyla 3,16-7,36 ng/ml ve 18,5-38,5 ng/ml'yd.

Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması: 40 kat konsantre yıkama solüsyonu distile su ile seyreltildi. (30 ml konsantre yıkama solüsyonu 1170 ml distile su ile seyreltildi.)

Hepsidin çalışma prosedürü Tablo 4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4:** Hepsidin çalışma prosedürü

	Standart	Kontrol	Numune
Assay Tamponu	100 µl	100 µl	100 µl
Standart (0-5)	20 µl	-	-
Kontrol	-	20 µl	-
Numune	-	-	20 µl
Enzim Konjugat	50 µl	50 µl	50 µl
Oda ısısında plak çalkalayıcıda 300-700 rpm'de 60 dakika inkübasyon			
İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama			
Enzim kompleksi	100 µl	100 µl	100 µl
Oda ısısında 30 dakika inkübasyon			
İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama			
Substrat solüsyonu	100 µl	100 µl	100 µl
Oda ısısında 20 dakika inkübasyon			
Stop solüsyonu	100 µl	100 µl	100 µl

ELİSA okuyucu cihazda 450 nanometrede absorbanslar alındı. Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı.

Üretici firma tarafından tespit edilmiş deteksiyon limiti 0.35 ng/ml olup ölçüm için kesinlik göstergesi olan gün içi CV %2.1-9.9 ve günler arası CV %11.5-14.6'dır.

Referans Aralığı: Üretici firma tarafından 292 normal sağlıklı bireylerin taze serumu ölçüldüğünde, ortalaması 10.1 ng/ml (ortanca 7.2 ng/ml) olarak bulunmuştur.

### 3.4.6. hsCRP ölçümü

Serum hsCRP düzeyinin ölçümü solid faz ELİSA prensibine dayanan hsCRP (DRG Diagnostics, Marburg, GERMANY) kiti kullanılarak yapıldı.



**Testin Prensibi:** Analizde kullanılan mikrokuyucukların duvarları CRP'ye karşı geliştirilmiş monoklonal antikolarla kaplıdır. İlk inkübasyon sırasında CRP standartları ile örnekler kuyucuklara pipetlenir. Sonrasında ortama CRP enzim konjugat reaktifi eklenir. Bu enzimin antikora bağlanması ile sandviç kompleksi oluşur ve oda ısısında 45 dakika inkübe edilir. Bir sonraki aşamada yıkama yapılır ve bağlanmayan antikolar ortamdaki uzaklaştırılır. Sonrasında ortama TMB reaktifi eklenerek reaksiyon başlatılır ve reaksiyonda renk değişimi meydana gelir. 20 dakika inkübasyon sonrasında stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılır. Daha sonra renklenmiş ürünlerin absorbansı 450 nanometrede okutulur.

Kit İçeriği:

- Anti-CRP antikoları ile kaplanmış plak (8x12=96 kuyucuk)
- Standart seti
- Numune dilüenti
- CRP enzim konjugat
- TMB reaktifi
- Stop solüsyonu

Standartların Hazırlanması: Konsantrasyonları sırasıyla, 0 mg/L, 0.005 mg/L, 0.010 mg/L, 0.025 mg/L, 0.050 mg/L ve 0.100 mg/L olan standartlar kullanıma hazırdır.

Numunelerin Hazırlanması: Numuneler 1:100 oranında numune dilüenti ile seyreltilir. (5 µl numune + 495 µl numune dilüenti)

hsCRP çalışma prosedürü Tablo 5'te gösterilmiştir.

**Tablo 5:** hsCRP çalışma prosedürü

	Standart	Numune
Standart	10 µl	-
Numune (Dilüe)	-	10 µl
Enzim konjugat	100 µl	100 µl
Oda ısısında 45 dakika inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 300 µl distile su ile 3 kez yıkama		
TMB solüsyonu	100 µl	100 µl
Oda ısısında 20 dakika inkübasyon		
Stop solüsyonu	100 µl	100 µl

ELİSA okuyucu cihazda 450 nanometrede absorbanlar alındı. Kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak cihaz tarafından verilen sonuçlar dilüsyon faktörü olan 100 ile çarpılarak hesaplandı.

Üretici firma tarafından tespit edilmiş deteksiyon limiti 0.1 mg/L olup ölçüm için kesinlik göstergesi olan gün içi CV %2.3-7.5 ve günler arası CV %2.5-4.1'dir.

Referans Aralığı: Literatürde sağlıklı bireylerde yapılmış çalışmalarda yetişkin serumunda 0.068 ile 8.2 mg/L arası değerler elde edilmiştir.

### 3.4.7. IL-6 ölçümü

Serum human IL-6 düzeyinin ölçümü standart sandviç ELİSA prensibine dayanan IL-6 (Boster Biological Technology, Fremant, USA) kiti kullanılarak yapıldı.

**Testin Prensi:** Analizde kullanılan mikrokuyucukların duvarları IL-6'ya karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlarla kaplıdır. İlk inkübasyon sırasında IL-6 standartları, örnekler ve numune dilüent tamponu kuyucuklara pipetlenir plağın üzeri kapatılır ve 37 °C'de 90 dakika inkübe edilir. İnkübasyondan sonra plağın üzeri açılır ve plak içeriği aspire edilerek boşaltılır. Sonrasında biyotin ile işaretli ikincil monoklonal insan IL-6 antikor eklenir ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edilir. İnkübasyondan sonra 0.01 M fosfat tamponu ile yıkanır. Yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1 dakika bekletilir. Daha sonra avidin-biyotin-peroksidaz enzim kompleksi ortama eklenir ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edilir. Bu enzimin biyotinize antikora bağlanması ile sandviç kompleksi oluşur. İnkübasyon sonunda 0.01 M fosfat

tamponu ile yıkama yapılır. Her yıkamada yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1 dakika bekletilir. Sonrasında ortama substrat solüsyonu eklenerek reaksiyon başlatılır ve reaksiyonda renk değişimi meydana gelir. 37 °C’de 30 dakika inkübasyon sonrasında stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılır. Daha sonra renklenmiş ürünlerin absorbansı 450 nanometrede okutulur. Oluşan renk yoğunluğu IL-6 konsantrasyonu ile orantılıdır.

Kit içeriği:

- Anti-human IL-6 antikorları ile kaplanmış plak (8x12=96 kuyucuk)
- Liyofilize human IL-6 standart
- Numune dilüsyon tamponu
- Biotinile anti-human IL-6 antikor
- Antikor dilüsyon tamponu
- Avidin-Biyotin-Peroksidaz Kompleksi (ABC)
- ABC dilüsyon tamponu
- TMB renklendirici ajan
- TMB stop solüsyonu

Standartların Hazırlanması: Konsantrasyonu 10.000 pg/ml olan standart 1 ml numune dilüsyon tamponu ile çözülüp yavaşça çalkalandı, 10 dakika oda sıcaklığında iyice çözünmesi beklendi. Bu stok çözümden 0.03 ml alınıp 0.97 ml numune dilüenti ile dilüe edilerek 300 pg/ml konsantrasyonunda ikinci çözelti hazırlandı. Daha sonra seri dilüyonlar ile 150 pg/ml, 75 pg/ml, 37.5 pg/ml, 18.75 pg/ml, 9.38 pg/ml, 4.69 pg/ml standartları oluşturuldu.

Biyotinize Anti-Human IL-6 Antikor Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması: Konsantre biyotinize anti-human IL-6 antikor antikor dilüent tamponu ile 1:100 oranında her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde hazırlandı (120 µl konsantre biyotinize anti-human IL-6 antikor + 11800 µl antikor dilüent tamponu).

Avidin-Biyotin-Peroksidaz Kompleksi (ABC) Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması: Her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde konsantre Avidin-Biyotin-Peroksidaz kompleksi 1:100 oranında ABC dilüsyon tamponu ile dilüe edildi (120 µl konsantre Avidin-Biyotin-Peroksidaz Kompleksi (ABC) + 11800 µl ABC dilüsyon tamponu).

Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması: Yıkama solüsyonu olarak 0.01 M fosfat tampon çözeltisi kullanıldı. Çözeltiyi hazırlamak için 8.5 g sodyum klorür, 1.4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 0.2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  bir miktar distile suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı 7.2-7.6 olacak şekilde ayarlandı ve son hacmi distile su ile 1 litreye tamamlandı.

IL-6 çalışma prosedürü Tablo 6'da gösterilmiştir.

**Tablo 6:** IL-6 çalışma prosedürü

	Zero	Standart	Numune
Numune dilüent tamponu	100 µl	-	-
Standart (1-7)	-	100 µl	-
Numune	-	-	100 µl
Plağın üzeri kapatılır ve 37 °C'de 90 dakika inkübasyon			
İnkübasyondan sonra plak içeriği aspire edilerek boşaltılır			
Biyotinize anti-human IL-6 antikorlu çalışma solüsyonu	100 µl	100 µl	100 µl
37 °C'de 1 saat inkübasyon			
İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk 300 µl 0.01 M fosfat tampon solüsyonu ile 3 kez yıkama Her yıkamada yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1 dakika bekletilir.			
ABC çalışma solüsyonu	100 µl	100 µl	100 µl
37 °C'de 30 dakika inkübasyon			
İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 300 µl 0.01 M fosfat tampon solüsyonu ile 5 kez yıkama Her yıkamada yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1 dakika bekletilir.			
TMB renklendirici ajan	90 µl	90 µl	90 µl
37 °C'de 30 dakika inkübasyon (karanlıkta)			
TMB stop solüsyonu	100 µl	100 µl	100 µl

ELİSA okuyucu cihazda 450 nanometrede absorbanslar alındı. Her kuyucuğun absorbansından zero kuyucuğunun absorbansı çıkarılarak relatif absorbanslar hesaplandı. Standart solüsyonlarının da relatif absorbansları

hesaplanarak oluşturulan standart eğrisi yardımıyla numune konsantrasyonları bulundu.

### 3.4.8. Hemojuvelin ölçümü

Serum human hemojuvelin düzeyinin ölçümü kantitatif sandviç ELİSA prensibine dayanan human hemochromatosis type 2/venile-uman homolog (HFE2) (Cusabio, Wuhan, CHINA) kiti kullanılarak yapıldı.

**Testin Prensibi:** Analizde kullanılan mikrokuyucukların duvarları hemojuveline karşı geliştirilmiş monoklonal antikörlerle kaplıdır. İlk inkübasyon sırasında hemojuvelin standartları, örnekler ve horseradish peroksidaz enzim konjugatı kuyucuklara pipetlenir. Bu enzimin antikora bağlanması ile sandviç kompleksi oluşur ve 37 °C’de 60 dakika inkübe edilir. Bir sonraki aşamada distile su ile yıkama yapılır ve bağlanmayan antikörler ortamdan uzaklaştırılır. Sonrasında ortama substrat A ve B eklenerek reaksiyon başlatılır ve renk değişimi meydana gelir. 37 °C’de 15 dakika karanlıkta inkübasyon sonrasında stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılır. Daha sonra renklenmiş ürünlerin absorbansı 450 nanometrede okutulur. Oluşan renk yoğunluğu hemojuvelin konsantrasyonu ile orantılıdır.

Kit içeriği:

- Hemojuvelin antikörleri ile kaplanmış plak (8x12=96 kuyucuk)
- Standart seti (S0-S5)
- Horseradish peroksidaz (HRP) konjugat
- Substrat A
- Substrat B
- Stop solüsyonu

Standartların Hazırlanması: Konsantrasyonları sırasıyla 0 ng/ml, 125 ng/ml, 375 ng/ml, 875 ng/ml, 2000 ng/ml, 4000 ng/ml olan standart seti kullanıma hazırды.

Hemojuvelin çalışma prosedürü Tablo 7’de gösterilmiştir.

**Tablo 7:** Hemojuvelin çalışma prosedürü

	Standart	Numune
Standart	50 µl	-
Numune	-	50 µl
HRP konjugat	50 µl	50 µl
37 °C'de 1 saat inkübasyon		
İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 200 µl distile su ile 3 kez yıkama		
Substrat A	50 µl	50 µl
Substrat B	50 µl	50 µl
37 °C'de 15 dakika inkübasyon (karanlıkta)		
Stop solüsyonu	50 µl	50 µl

ELİSA okuyucu cihazda 450 nanometrede absorbanlar alındı. Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı.

Üretici firma tarafından tespit edilmiş deteksiyon limiti 125 ng/ml olup ölçüm için kesinlik göstergesi olan gün içi CV % <15 ve günler arası CV % <15'dir.

### 3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilks testi ile incelendi. Sayısal değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama±standart sapma, kategorik yapıdaki veriler için sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Kategorik yapıdaki değişkenler bakımından gruplar arasındaki farklılıklar Ki-kare testi ile incelendi Sayısal değişkenler bakımından iki grubun karşılaştırılmasında parametrik test varsayımları sağlandığında iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi, sağlanmadığında ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. İki sayısal değişken arasındaki doğrusal ilişki parametrik test varsayımları sağlandığında Pearson korelasyon analizi ile, sağlanmadığında ise Spearman korelasyon analizi ile incelendi. Sonuçlar % 95 güven aralığında değerlendirildi ve p<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda, OUAS tanısı konulan 34-72 yaş aralığında 25 erkek ve 12 kadın toplam 37 hasta ve 35-63 yaş aralığında 25 erkek ve 11 kadın toplam 36 kontrol grubu incelendi. Gruplar incelendiğinde yaş ve vücut kitle indeksleri (VKİ) açısından farklılık bulunmadı (Tablo 8).

**Tablo 8:** Hastalara ve kontrollere ait demografik özellikler

	<b>Hasta (n=37)</b>	<b>Kontrol (n=36)</b>	<b>p</b>
<b>Yaş</b>	53.1±9.2	50.6±6.5	0.196
<b>VKİ (kg/m<sup>2</sup>)</b>	32.3±6.0	31.3±4.3	0.445

OUAS hasta grubu ve kontrol grubu arasındaki IL-6, hsCRP, sTfR, hepsidin, hemojüvelin, demir, TDBK ve ferritin ölçüm değerlerinin karşılaştırılması Tablo 9'da gösterildi.

**Tablo 9:** OUAS hasta grubu ve kontrol grubunun ölçüm değerlerinin karşılaştırılması

	<b>Hasta n=37</b>	<b>Kontrol n=36</b>	<b>P</b>
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	89.1±60.3	59.3±45.5	<b>0.012</b>
<b>hsCRP (mg/L)</b>	10.0±22.5	3.8±5.0	<b>0.031</b>
<b>sTfR (µg/ml)</b>	1.13±0.40	0.96±0.28	<b>0.035</b>
<b>Hepsidin (ng/ml)</b>	19.9±6.9	21.9±10.1	0.860
<b>Hemojüvelin (ng/ml)</b>	1670±860.9	1055±623.2	<b>0.002</b>
<b>Demir (µg/dl)</b>	86.7±33.4	77.8±29.5	0.307
<b>TDBK (µg/dl)</b>	321.8±46.1	325.9±40.5	0.688
<b>Ferritin (ng/ml)</b>	74.3±55.5	45.1±28.8	<b>0.010</b>

Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında hasta grubunda IL-6, hsCRP, sTfR, hemojuvelin ve ferritin düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p < 0.05$ ). Ancak gruplar arasında hepsidin, demir ve total demir bağlama kapasite düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık görülmedi ( $p > 0.05$ ).

Hasta grubunda AHI değerlerinin parametrelerle arasındaki korelasyonlar incelendi. Ancak hiçbir parametrede AHI düzeylerine göre anlamlı bir korelasyon gözlenmedi ( $p > 0.05$ ). AHI gruplarının kontrol grubundan anlamlılıkları ise Tablo 10'da gösterildi.

**Tablo 10:** AHI gruplarının kontrol grubuyla karşılaştırılması

	Kontrol n=36	Hasta n=37		
		Hafif n=10	Orta n=8	Ağır n=19
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	59.3±45.5	104.8±92.3	73.5±48.0	<b>87.4±43.2*</b>
<b>hsCRP (mg/L)</b>	3.8±5.0	5.9±8.8	6.6±5.1	<b>13.7±30.5*</b>
<b>sTfR (µg/ml)</b>	0.96±0.28	1.05±0.58	1.10±0.23	<b>1.17±0.35*</b>
<b>Hepsidin (ng/ml)</b>	21.9±10.1	18.2±5.7	19.2±5.7	20.6±8.4
<b>Hemojuvelin (ng/ml)</b>	1055±623.2	1345.4±804.6	1470,7± 512.2	<b>1881.0±987.4*</b>
<b>Demir (µg/dl)</b>	77.8±29.5	81.9±36.6	85.4±37.4	90.2±30.2
<b>TDBK (µg/dl)</b>	325.9±40.5	328.8±39.0	317.4±45.2	319.0±50.8
<b>Ferritin (ng/ml)</b>	45.1±28.8	48.6±30.1	67.8±32.4	<b>90.4±67.7*</b>

\*  $p < 0.05$

Çalışılan parametreler arasındaki korelasyonlar incelendiğinde, IL-6 ve hsCRP, hsCRP ve TFR, ferritin ve hemojuvelin arasında anlamlı korelasyon gözlemlendi. Bu korelasyonlar Tablo 11'de gösterildi. Bu parametreler dışında anlamlı bir farklılık gözlenmedi.



**Tablo 11:** Parametreler arasındaki korelasyonların karşılaştırılması.

<b>Parametreler</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
IL-6 - hsCRP	0.322	0.005
hsCRP - TFR	0.318	0.006
Ferritin - Hemojuvelin	0.925	<0.0001

## 5. TARTIŞMA

OUAS hipoksi ve reoksijenizasyonun tekrarlayan döngüleriyle karakterize bir hastalıktır. Hastalığın obezite, metabolik disregülasyon ve kardiyovasküler hastalıklar ile birlikteliği sıklıkla görülür (44,146,147). Bu nedenle hastalığın lokal bir anormallikten çok, morbidite ve mortalite oranını artıran sistemik etkili bir hastalık olduğu düşünülür.

OUAS’nda nedeni tam olarak belli olmayan, lokal ve sistemik inflamasyon bulguları bulunmaktadır (148,149). Entzian ve ark. OUAS’lu hastalarda yaptıkları çalışmada, TNF- $\alpha$ ’nın sirkadiyen ritminin bozulduğunu, nokturnal pikin kaybolup ek bir gündüz pikinin ortaya çıktığını göstermişlerdir (150). OUAS hastalarından izole edilen T lenfositlerinde TNF- $\alpha$ ’nın daha fazla eksprese edildiği ve orta-ağır OUAS’lu hastaların monositlerinden TNF- $\alpha$  sentezinin arttığı gösterilmiştir (5,151). İlerleyen çalışmalar da ise OUAS’nun şiddetiyle TNF- $\alpha$ ’nın önemli bir ilişkisi olduğu, CPAP tedavisiyle düzelen hasta semptomlarıyla birlikte TNF- $\alpha$ ’nın önemli oranda düştüğü rapor edilmiştir (152). OUAS hastalarında yapılan birçok incelemede IL-6 düzeylerinin de arttığı gözlenmiştir (153,154). IL-6, CRP’nin hepatik üretimi için ana uyarıcıdır ve yükselmiş düzeyleri sıklıkla CRP ile ilişkilidir. Japonya’da yapılan iki büyük kesitsel çalışmada, gece hipoksisinde yükselmiş serum CRP seviyelerinin hastalık için bağımsız bir belirleyici olduğu gösterilmiştir (155,156). Ancak bazı çalışmalarda ise CRP’nin uyku apnesi veya nokturnal hipoksemiden daha çok obeziteyle ilişkili olduğu öne sürülmüştür (157). Biz de çalışmamızda OUAS hastalarında IL-6 ve hsCRP düzeylerini anlamlı olarak yüksek bulduk. OUAS’nun kardivasküler sistem üzerine etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda bulunan sonuçlara benzer bir şekilde, biz de çalışmamızda hem IL-6 hem de hsCRP ile AHI arasında ilişki bulamadık (158). Bu sonuçlar bize IL-6 ve hsCRP’nin, hipoksi şiddetinden bağımsız olarak arttığını düşündürmektedir.

Hipoksi, eritropoetik kompartmanın artan demir ihtiyacını karşılamak için intestinal demir emilimi ve hücrel depolardan demir salınımını artırmak gibi adaptif etkileri indükler (159). Akut hipoksiye maruziyet sonrası eritrositlerin hemoglobin sentezi için gerekli demir miktarını sağlamak için eritropoetin aktivasyonu ilk görülen etkidir (160). Hipoksiyle karakterize olan OUAS

hastalarında yapılan çalışmalarda serum eritropoetin düzeylerinin anlamlı olarak yükseldiği görülmüştür (161). Normobarik hipoksiye maruz kalan kişilerde eritropoetin seviyeleriyle uyumlu olarak serum sTfR düzeylerinin de 5 ile 7. günlerde anlamlı olarak arttığı görülmüştür (162). Çalışmamızda OUAS hastalarında serum demir düzeyi ve demir bağlama kapasitesinde kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda anlamlı bir değişiklik saptanmadı. sTfR düzeyleri ise OUAS grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu, hipoksiye bağlı olarak arttığını düşündüğümüz bu parametrenin hipoksinin şiddeti ile bir ilişkisi olmadığı gözlemlendi.

Hepsidin sistemik demir dengesini düzenleyen karaciğerden salınan bir hormondur. Birçok hücre kültürü ve hayvan çalışmasında laboratuvar koşullarında oluşturulan hipoksik maruziyetin, eritropoetin hormonu etkisiyle hepsidin üretimini baskıladığı gösterilmiştir (163,164). Sağlıklı insanlarda ise yüksek rakımlarda oluşan hipoksik durumda hepsidin 16 ile 40 saat sonra baskılanmaya başlandığı ve birkaç gün sonra bu azalmanın pik yaptığı ve uzun bir süre bu şekilde devam ettiği gözlenmiştir (160). Hepsidin baskılanması demirin kullanılabilirliğini sağlayarak eritropoezise katkı sağlar. Hepsidin inflamasyonla ilişkili kronik hastalıklarda görülen anemilerin patogenezinde de rol oynadığı görülmüştür. Özellikle IL-6'nın hepsidin ekspresyonunu STAT3 yoluyla regüle etmesi, eritropoez için demir kullanılabilirliğini kısıtlayarak anemi oluşumuna ve bu anemilerde görülen demir yüklenmesine belirgin katkıda bulunmaktadır (12). OUAS hastalığı gibi inflamatuvar bir hastalık olan metabolik sendrom hastalarında serum ferritin düzeylerinin, inflamasyona bağlı olarak arttığı gözlenmiş ve bu artışa hepsidin üretiminin baskılanmasının da katkısı olduğu düşünülmüştür (165). Çalışmamızda OUAS hastalarında hepsidin düzeylerinde anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemledik. Hepsidin, hem inflamasyon belirteçleri olan IL-6 ve hsCRP düzeyleri ile hem de hipoksik maruziyeti yansıtan AHI değerleriyle bir ilişkisi bulunamadı. Çalışmamızda serum demir düzeyi ve demir bağlama kapasitesinde anlamlı bir değişiklik görülmedi. Bu veriler ışığında OUAS'nda serum hepsidin düzeylerinin serum demir düzeyleri ile uyumlu olarak seyrettiğini düşünmekteyiz.

Hemojuvelin hepsidin üretiminin düzenlenmesinde görev alan bir membran proteindir. Membrana bağlı hemojuvelin, BMP koreseptörüdür ve BMP/SMAD sinyal yolağı üzerinden hepsidin sentezini sağlar. Yapılan çalışmalar, membrana

bağlı hemojuvelinin proteolitik yıkılımını sağlayan furinin hipoksi ile aktive olduğunu göstermiştir (166). Bu nedenle hipoksida soluble HJV artışı gerçekleşir (167). Çalışmamızda OUAS hastalarında kontrollere göre hemojuvelin düzeylerinde anlamlı bir yükselme olduğunu gözlemledik, ancak hemojuvelin düzeyleri ile AHI arasında ilişki bulunamadı. Małyszko ve ark., hemodiyaliz hastaları ile sağlıklı gönüllüleri karşılaştırdıkları çalışmada inflamatuvar belirteçler olan IL-6, hsCRP ile hemojuvelin düzeylerinde anlamlı olarak bir artış saptamışlardır. Bu çalışmada hemojuvelin düzeyleri ve inflamasyon belirteçleri arasında ilişki bulunmaz iken, hemojuvelin ve ferritin arasında güçlü bir korelasyon olduğunu gözlemlemiştirlerdir (168). Biz de Małyszko ve ark ile uyumlu olarak, OUAS’nda hemojuvelin ile IL-6 ve hsCRP arasında bir ilişki saptamadık, ancak hemojuvelinin pozitif akut faz reaktanı olan ferritin ile arasında çok yüksek bir korelasyon olduğu gözlemledik.

Çalışmamızda ortaya konulan bulgular oldukça önemli olmakla beraber çalışmamızın bazı kısıtlılıkları mevcuttur. Olgu sayısının sınırlı olması nedeni ile bazı altgruplarda olgu sayısı yetersizdir. Ayrıca çalışmamızda, bu metabolik yolda görevli birçok faktör değerlendirilememiş ve OUAS’nda yapılan CPAP tedavisinin ölçülen belirteçler üzerine etkisi gösterilmemiştir.

Sonuç olarak, literatürde OUAS hastalarında demir metabolizmasını incelemeye çalıştık. OUAS hastalarında IL-6 ve hsCRP artışıyla beraber inflamatuvar belirteçlerin arttığını gözlemledik. Bu hastalarda serum demir ve demir bağlama kapasitesinde herhangi bir farklılık gözlenmedi. Demir metabolizmasının negatif düzenleyici hormonu olan hepsidin düzeylerinin de demirle uyumlu olarak değişmediği gözlemlendi. Ancak bu hastalarda hemojuvelin, ferritin, sTfR düzeyinde artış saptandı. Bu verileri değerlendirdiğimizde OUAS hastalarında demir düzeylerinde her ne kadar farklılık gözlenmese de demir metabolizmasında rol alan moleküllerdeki anlamlı değişikliklerin hastalığın patogenezinde rol alan hipoksi ve inflamasyonla ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Bu metabolizmanın aydınlatılması için detaylı, yüksek katılımlı ve CPAP tedavisi içeren klinik ve deneysel çalışmalar planlanması gereklidir.

## 6. SONUÇLAR

OUAS hastalarında, demir metabolizmasını incelediğimiz çalışmamızda:

- 1- OUAS hastalarında IL-6 ve hs CRP gibi inflamatuvar belirteçlerin arttığı saptandı.
- 2- OUAS hastalarında hepsidin, serum demir ve demir bağlama kapasitesinde herhangi bir farklılık gözlemlenmedi.
- 3- Bu hastalarda hemojuvelin, ferritin, sTfR düzeyinde artış saptandı.

## 7. KAYNAKLAR

- 1-Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 328:1230–1235, 1993.
- 2-Suzuki YJ, Jain V, Park AM, Day RM. Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 40:1683–92, 2006.
- 3-Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225–260, 1998.
- 4-Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1313–1316, 1997.
- 5-Minoguchi K, Tazaki T, Yokoe T, Minoguchi H, Watanabe Y, Yamamoto M, Adachi M. Elevated production of tumor necrosis factor- $\alpha$  by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 126:1473–1479, 2004.
- 6- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>- dependent degradation domain via the ubiquitin–proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7987–7992, 1998.
- 7-Yuan G, Nanduri J, Khan S, Semenza GL, Prabhakar NR. Induction of HIF-1 $\alpha$  expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca<sup>2+</sup> signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol* 217:674–685, 2008.
- 8-Fandrey J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R977–R988, 2004.
- 9-Muñoz M, Villar I, García-Erce JA. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* 37:4617–26, 2009.
- 10-Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306:2090–2093, 2004.

- 11-Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest* 117:1933–1939, 2007.
- 12-Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 108:3204–3209, 2006.
- 13-Punjabi NM. The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc* 5:136–43, 2008.
- 14-Azagra- Calero E, Espinar-Escalona E, Barrera-Mora J-M, Llamas-Carreras J-M, Solano-Reina E. Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS). Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 17(6), 2012.
- 15-Köktürk O, Tatlıcıoğlu T, Kemaloğlu Y. Habitüel horlaması olan olgularda obstrüktif sleep apne sendromu prevalansı. *Tüberküloz ve Toraks* 45:7-11, 1997.
- 16-Stradling JR. Sleep-related breathing disorders. 1. Obstructive sleep apnoea: definitions, epidemiology, and natural history. *Thorax* 50:683-9, 1995.
- 17-Phillips BA, Anstead MI, Gottlieb DJ. Monitoring sleep and breathing: methodology. Part I: Monitoring breathing. *Clin Chest Med* 19(1):203-12, 1998.
- 18-Kwan SYL, Fleetham JA, Enarson DA, Chan-Yeung M. Snoring, obesity, smoking and systemic hypertension in a working population in British Columbia. *Am Rev Respir Dis* 143:A380, 1991.
- 19-Gozal D, O'Brien LM. Snoring and obstructive sleep apnoea in children: why should we treat? *Paediatr Respir Rev* 5 Suppl 1:S371–S376, 2004.
- 20-Strohl KP, Redline S. Recognition of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 154(2 Pt 1):279–89, 1996.
- 21-Bixler EO, Vgontzas AN, Lin HM, Ten Have T, Rein J, Vela-Bueno A, Kales A. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *Am J Respir Crit Care Med* 163(3 Pt 1):608–13, 2001.
- 22-Gaudette E, Kimoff RJ. Pathophysiology of OSA. *Eur Respir Mon* 50:31-50, 2010.

- 23-Gharibeh T, Mehra R. Obstructive sleep apnea syndrome: natural history, diagnosis, and emerging treatment options. *Nature and Science of Sleep* 2:233-55, 2010.
- 24-Erdinç E, Polatlı M, Kocabaş A, Yıldırım N, Gürgün A, Saryal S, Köktürk N, Yarkın T, Kıyan E, Kunt Uzaslan E, Sevinç C, Çöplü L, Sayner A, Günen H, Karakurt S, Ergün P, Erdinç M, Şen E, Umut S, Yılmaz V, Çımrın AH, Demir T. *Türk Toraks Dergisi Cilt:11 Ek:1*, 2010
- 25-Schwartz AR, Patil SP, Laffan AM, Polotsky V, Schneider H, Smith PL. Obesity and obstructive sleep apnea – pathogenic mechanisms and therapeutic approaches. *Proc Am Thorac Soc* 5:185-92, 2008.
- 26-Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 165(9):1217–1239, 2002.
- 27- Schwab RJ, Goldberg AN, Pack AL. Sleep apnea syndromes. Ed: Fishman AP. *Fishman’s Pulmonary Diseases and Disorders*. New York: McGraw - Hill Book Company 1617-37, 1998.
- 28-Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J. Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA* 284(23):3015–21, 2000.
- 29-Newman AB, Foster G, Givelber R, Nieto FJ, Redline S Young T. Progression and regression of sleep-disordered breathing with changes in weight: the Sleep Heart Health Study. *Arch Intern Med* 165(20):2408–13, 2005.
- 30-Ancoli-Israel S, Klauber MR, Stepnowsky C, Estline E, Chinn A, Fell R. Sleep-disordered breathing in African-American elderly. *Am J Respir Crit Care Med* 152(6 Pt 1):1946–9, 1995.
- 31- Wetter DW, Young TB, Bidwell TR, Badr MS, Palta M. Smoking as a risk faktör for sleep-disordered breathing. *Arch Intern Med* 154(19):2219-2224, 1994.
- 32-Guillemainault C, Stoohs R, Partinen M, Kryger M. Mortality and morbidity of obstructive sleep apnea syndrome. Prospective studies and retrospective cohorts. *Lung Biology in Health and Disease* 71:557-73, 1994.



- 33-Schwab RJ, Gupta KB, Gefter WB, Metzger LJ, Hoffman EA, Pack AI. Upper airway and soft tissue anatomy in normal subjects and patients with sleep-disordered breathing. Significance of the lateral pharyngeal walls. *Am J Respir Crit Care Med* 152(5 Pt 1):1673-89, 1995.
- 34-Cozzi F, Pierro A. Glossoptosis-apnoea syndrome in infancy. *Pediatrics* 75(5):836-43, 1985.
- 35- Kuna S, Remmers JE. Anatomy and Physiology of upper airway obstruction. Ed: Kryger MH, Roth T, Dement WC. *Principles and practice of Sleep Medicine*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company 840-58, 2008.
- 36- Schwab RJ, Remmers JE, Kuna ST. Chapter 101 – Anatomy and Physiology of Upper Airway Obstruction. Ed: Kryger MH, Roth T, Dement WC. *Principles and Practice of Sleep Medicine*, 5th ed. Missouri:Elsevier Saunders 1153-71, 2011.
- 37- Çiftçi B. Obstrüktif uyku apne sendromunda üst solunum yolu fizyopatoljisi. Ed: Acıcan T, Gülbay BE. *Türkiye Klinikleri Göğüs Hastalıkları Uyku özel sayısı* 1:46-9, 2008.
- 38-McNicholas WT. Diagnosis of obstructive sleep apnea in adults. *Proc Am Thorac Soc* 5(2):154-60, 2008.
- 39-Ohayon MM, Guilleminault C, Priest RG, Caulet M. Snoring and breathing pauses during sleep: telephone interview survey of a United Kingdom population sample. *BMJ* 314(7084):860-3, 1997.
- 40-Hoffstein V, Szalai JP. Predictive value of clinical features in diagnosing obstructive sleep apnea. *Sleep* 16:118-122, 1993.
- 41-Kiely JL, Murphy M, McNicholas WT. Subjective efficacy of nasal CPAP in the obstructive sleep apnoea syndrome: a prospective controlled study. *Eur Respir J* 13:1086-1090, 1999.
- 42-Kushida CA, Littner MR, Morgenthaler T, Alessi CA, Bailey D, Coleman J Jr, Friedman L, Hirshkowitz M, Kapen S, Kramer M, Lee-Chiong T, Loube DL, Owens J, Pancer J, Wise M. Practice parameters for the indications for polysomnography and related procedures: an update for 2005. *Sleep* 28(4):499-521, 2005.

- 43-Lam JC, Sharma SK, Lam B. Obstructive Sleep Apnoea: Definitions, epidemiology and natural history. *Indian J Med Res* 131:165-170, 2010.
- 44- McNicholas WT, Bonsignore MR. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur Respir J* 29(1):156–78, 2007.
- 45-Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109(1):33–44; 2000.
- 46-Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome - an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev* 7(1):35–51, 2003.
- 47-Ohga E, Tomita T, Wada H, Yamamoto H, Nagase T, Ouchi Y. Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1. *J Appl Physiol* 94:179–184, 2003.
- 48-Ohga E, Nagase T, Tomita T, Teramoto S, Matsuse T, Katayama H, Ouchi Y. Increased levels of circulating ICAM-1, VCAM-1 and L-selectin in obstructive sleep apnea syndrome. *J Appl Physiol* 87(1):10-14, 1999.
- 49-Semenza GL, Prabhakar NR. HIF-1-dependent respiratory, cardiovascular, and redox responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxid Redox Signal* 9:1391-6, 2007.
- 50-Cummins EP, Taylor CT. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* 450: 363–371, 2005.
- 51- Winnicki M, Shamsuzzaman A, Lanfranchi P, Accurso V, Olson E, Davison D, Somers VK. Erythropoietin and obstructive sleep apnea. *Am J Hypertens* 17:783–786, 2004.
- 52-Imagawa S, Yamaguchi Y, Higuchi M, Neichi T, Hasegawa Y, Mukai HY, Suzuki N, Yamamoto M, Nagasawa T. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea–hypopnea syndrome. *Blood* 98:1255–1257, 2001.

- 53-Juhan-Vague I, Pyke SD, Alessi MC, Jespersen J, Haverkate F, Thompson SG. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. ECAT Study Group. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Circulation* 94:2057–63, 1996.
- 54-Wessendorf TE, Thilmann AF, Wang YM, Schreiber A, Konietzko N, Teschler H. Fibrinogen levels and obstructive apnea in ischemic stroke. *Am J Respir Crit Care Med* 162:2039–42, 2000.
- 55-Reinhart WH, Oswald J, Walter R, Kuhn M. Blood viscosity and platelet function in patients with obstructive sleep apnea syndrome treated with nasal continuous positive airway pressure. *Clin Hemorheol Microcirc* 27:201–7, 2002.
- 56-Rangemark C, Hedner JA, Carlson JT, Glerup G, Winther K. Platelet function and fibrinolytic activity in hypertensive and normotensive sleep apnea patients. *Sleep* 18:188–94, 1995.
- 57-Parati G, Lombardi C, Narkiewicz K. Sleep apnea: epidemiology, pathophysiology and relation to cardiovascular risk. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293:R1671-R1683, 2007.
- 58-Blasi A, Jo JA, Valladares E, Juarez R, Baydur A, Khoo MC. Autonomic cardiovascular control following transient arousal from sleep: a time-varying closed-loop model. *IEEE Trans Biomed Eng* 53:74-82, 2006.
- 59-Goldstein DS, Eisenhofer G, Kopin IJ. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 305:800-11, 2003.
- 60-Fletcher EC, Miller J, Schaaf JW, Fletcher JG. Urinary catecholamines before and after tracheostomy in patients with obstructive sleep apnea and hypertension. *Sleep* 10:35-44, 1987.
- 61-Somers VK, Dyken ME, Clary MP, Abboud FM. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest* 96:1897-904, 1995.

- 62-Schulz R, Schmidt D, Blum A, Lopes-Ribeiro X, Lucke C, Mayer K, Olschewski H, Seeger W, Grimminger F. Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy. *Thorax* 55: 1046–1051, 2000.
- 63-Ohike Y, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Kojima T, Ohga E, Santa T, Imai K, Hashimoto M, Yoshizumi M, Ouchi Y. Amelioration of vascular endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea syndrome by nasal continuous positive airway pressure—possible involvement of nitric oxide and asymmetric NG, NG-dimethylarginine. *Circ J* 69: 221–226, 2005.
- 64-Phillips BG, Narkiewicz K, Pesek CA, Haynes WG, Dyken ME, Somers VK. Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure. *J Hypertens* 17: 61–66, 1999.
- 65-Kokturk O, Ciftci TU, Mollarecep E, Ciftci B. Elevated C-reactive protein levels and increased cardiovascular risk in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Int Heart J* 46: 801–809, 2005.
- 66-Coughlin SR, Mawdsley L, Mugarza JA, Calverley PM, Wilding JP. Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *Eur Heart J* 25: 735–741, 2004.
- 67-Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117:285-297, 2004.
- 68-Pereira IAC, Teixeira M, Xavier AV. Bioinorganic chemistry: Trace element evolution from anaerobes to aerobes. Ed: Williams RJP. Springer-Verlag; New York, NY: 91-190, 2010.
- 69-Muñoz Gómez M, Campos Garríguez A, García Erce JA, Ramírez Ramírez G. Fisiopathology of iron metabolism: diagnostic and therapeutic implications *Nefrologia* 25:9–19, 2005.
- 70-Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 341:1986–1995; 1999.
- 71-Siah CW, Ombiga J, Adams LA, Trinder D, Olynyk JK. Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. *Clin Biochem Rev* 27:5–16, 2006.

- 72-Krishnamurthy P, Xie T, Schuetz JD. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther* 114:345–58, 2007.
- 73-Riedel H-D, Remus AJ, Fitscher BA, Stremmel W. Characterization and partial purification of a ferrireductase from human duodenal microvillus membranes. *Biochem J* 309:745–8, 1995.
- 74-McKie AT. The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochem Soc Trans* 36:1239–41, 2008.
- 75-Hurrell R, Eqli I. Iron bioavailability and dietary reference values. *AJCN* 91:1461S–1467S, 2010.
- 76-Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 275:19906–12, 2000.
- 77-Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403:776–81, 2000.
- 78-Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 21:195–9, 1999.
- 79-Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr* 22:439–58, 2002.
- 80-Stein J, Hartmann F, Dignass AU. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nature Reviews Gastroenterology&Hepatology* 7:559-610, 2010.
- 81-Domenic ID, Ward DM, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9:72-81, 2008.
- 82-Aisen P. Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells. *Met Ions Biol Syst* 35:585–631, 1998.

- 83- Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2258–62, 1983.
- 84-Shih YJ, Baynes RD, Hudson BG, Flowers CH, Skikne BS, Cook JD. Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. *J. Biol. Chem* 265:19077–19081, 1990.
- 85- Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta* 329(1-2):9-22, 2003.
- 86-Serteser M, İnal C, Habif S. *Türk Klinik Biyokimya Derneği, Temel Hematolojik Testler Klavuzu*, 2004.
- 87- Beguin Y, Oris R, Fillet G. Dynamics of erythropoietic recovery after bone marrow transplantation: role of marrow proliferative capacity and erythropoietin production in autologous versus allogeneic transplants. *Bone Marrow Transplant* 11:285–92, 1993.
- 88-Huebers HA, Beguin Y, Pootrakul P, Einspahr D, Finch CA. Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood* 75:102–7, 1990.
- 89-Gérard B, Farman N, Raja KB, Eugène E, Grandchamp B, Beaumont C. Expression of H and L ferritin mRNAs in mouse small intestine. *Exp Cell Res* 228(1):8-13, 1996.
- 90-Jacobs A, Miller F, Worwood M, Beamish MR, Wardrop CA. Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Br Med J* 4:206–208; 1972.
- 91- Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC, Osborne NJ, Delatycki MB, Nicoll AJ, McLaren CE, Bahlo M, Nisselle AE, Vulpe CD, Anderson GJ, Southey MC, Giles GG, English DR, Hopper JL, Olynyk JK, Powell LW, Gertig DM. Iron overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med* 358:221–230, 2008.
- 92- Konijn AM, Hershko C. Ferritin synthesis in inflammation. I. Pathogenesis of impaired iron release. *Br J Haematol* 37:7–16, 1977.

- 93-Beard JL, Murray-Kolb LE, Rosales FJ, Solomons NW, Angelilli ML. Interpretation of serum ferritin concentrations as indicators of total-body iron stores in survey populations: the role of biomarkers for the acute phase response. *Am J Clin Nutr* 84:1498–1505, 2006.
- 94-Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Letters* 480(2-3):147–150, 2000.
- 95- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276:7806–7810, 2001.
- 96-Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* 93:90-97, 2008.
- 97-Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 102:783–788, 2003.
- 98-Preza GC, Ruchala P, Pinon R, Ramos E, Qiao B, Peralta MA, Sharma S, Waring A, Ganz T, Nemeth E. Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload *J Clin Invest* 121:4880-8, 2011.
- 99- Zang A-S. Control of Systemic Iron Homeostasis by the Hemojuvelin-Hepcidin Axis. *Adv. Nutr.*1:38-45, 2010.
- 100- De Domenico I, Lo E, Ward DM, Kaplan J. Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(10):3800-5, 2009.
- 101-Coyne DW. Hepcidin: clinical utility as a diagnostic tool and therapeutic target. *Kidney International* 80:240–244, 2011.
- 102-Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, Chung RT, Schneyer AL, Woolf CJ, Andrews NC, Lin HY. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nature genetics* 38:531–539, 2006.

- 103- Corradini E, Meynard D, Wu Q, Chen S, Ventura P, Pietrangelo A, Babitt JL. Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. *Hepatology* 54:273–284, 2011.
- 104- Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 108:3204–3209, 2006.
- 105-Stein J, Hartmann F, Dignass AU. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 7:599-610, 2010.
- 106-Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dubé MP, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson J, Risler JK, Zaborowska C, Babakaiff R, Radoski CC, Pape TD, Davidas O, Christakis J, Brissot P, Lockitch G, Ganz T, Hayden MR, Goldberg YP. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 36(1):77-82, 2004.
- 107-Niederkofler V, Salie R, Sigrist M, Arber S. Repulsive guidance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system. *J Neurosci* 24(4):808-18, 2004.
- 108-Niederkofler V, Salie R, Arber S. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J Clin Invest.* 115(8):2180-6, 2005.
- 109-Lin L, Goldberg YP, Ganz T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood* 106(8):2884-9, 2005.
- 110-Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P, Cooperman S, Eckhaus M, Rouault T, Mishra L, Deng CX. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 2:399-409, 2005.
- 111- Feng XH, Derynck R. Review Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:659-93, 2005.



- 112-Andriopoulos B Jr, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, Knutson MD, Pietrangelo A, Vukicevic S, Lin HY, Babitt JL. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* 41(4):482-7 2009.
- 113-Lin L, Nemeth E, Goodnough JB, Thapa DR, Gabayan V, Ganz T. Soluble homojuvelin is released by proprotein convertase-mediated cleavage at a conserved polybasic RNRR site. *Blood Cells Molecules and Diseases* 40:122-131, 2008.
- 114-Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest* 117:1933–1939, 2007.
- 115-Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* 4(suppl 3):S233-S242, 2002.
- 116-Murakami M, Hirano T. The Pathological and Physiological Roles of IL-6 Amplifier Activation. *International Journal of Biological Sciences*, 8(9):1267-1280, 2012.
- 117- Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* 8:S2, 2006.
- 118-Somers W, Stahl M, Seehra JS. 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J* 16:989-97, 1997.
- 119-Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54:1–78, 1993.
- 120-Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med* 51:245–270, 2000.
- 121-Bihl MP, Heinemann K, Rüdiger JJ, Eickelberg O, Perruchoud AP, Tamm M, Roth M. Identification of a novel IL-6 isoform binding to the endogenous IL-6 receptor. *Am J Resp Cell Mol Biol* 27:48–56, 2002.

- 122-Helle M, Boeije L, Pascual-Salcedo D, Aarden L. Differential induction of interleukin-6 production by monocytes, endothelial cells and smooth muscle cells. *Prog Clin Biol Res* 367:61–71, 1991.
- 123-Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest* 121:3375–83, 2011.
- 124-Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, Akira S. Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2207–2211, 1993.
- 125- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334:297–314, 1998.
- 126-Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86:1243–1254, 1995.
- 127-Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265:621–636, 1990.
- 128-Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J* 15:43–58, 2001.
- 129-Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340:448–454, 1999.
- 130-Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. Catabolic proinflammatory cytokines. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1:245–251, 1998.
- 131-Walsh D, Mahmoud F, Barna B. Assessment of nutritional status and prognosis in advanced cancer: interleukin-6, C-reactive protein, and the prognostic and inflammatory nutritional index. *Support Care Cancer* 11:60–62, 2003.
- 132-Deans C, Wigmore SJ. Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8:265–269, 2005.

- 133-Hattori M, Abraham LJ, Northemann W, Fey GH. Acute-phase reaction induces a specific complex between hepatic nuclear proteins and the interleukin 6 response element of the rat alpha 2-macroglobulin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2364–8, 1990.
- 134-Vgontzas AN, Bixler EO, Lin HM, Prolo P, Trakada G, Chrousos GP. IL-6 and its circadian secretion in humans. *Neuroimmunomodulation* 12:131–140, 2005.
- 135-Tillett WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med* 52:561–7, 1930.
- 136-Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol* 28:157–183, 2010.
- 137-Whitehead AS, Bruns GAP, Markham AF, Colten HR, Woods DE. Isolation of human C-reactive protein complementary RNA and localization of the gene to chromosome 1. *Science* 221:69–71, 1983.
- 138-Oliveira EB, Gotschlich EC, Liu T-Y. Primary structure of human C-reactive protein. *J Biol Chem* 254:489–502, 1970.
- 139-Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* 7:169–177; 1999.
- 140-Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentraxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 34:141–212, 1983.
- 141-Lu J, Marnell LL, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, Sun PD. Structural recognition and functional activation of FcγR by innate pentraxins. *Nature* 456:989–992, 2008.
- 142- Bijl M, Bootsma H, Van Der Geld Y, Limburg PC, Kallenberg CG, Van Rijswijk MH. Serum amyloid P component levels are not decreased in patients with systemic lupus erythematosus and do not rise during an acute phase reaction. *Ann Rheum Dis* 63:831–835, 2004.

- 143-Beqja-Lika A, Bulo-Kasneci A, Refatllari E, Heta-Alliu N, Rucaj-Barbullushi A, Mone I, Mitre A. Serum Procalcitonine Levels as an Early Diagnostic Indicator of Sepsis. *Mat Soc Med* 25(1):23-25, 2013.
- 144- Du Clos TW, Mold C. Pentraxins (CRP, SAP) in the process of complement activation and clearance of apoptotic bodies through Fcγ receptors, *Curr Opin Organ Transplant* 16(1):15-20, 2011.
- 145-Kimberly MM, Vesper HW, Caudill SP, Cooper GR, Rifai N, Dati F, Myers GL. Standardization of immunoassays for measurement of high-sensitivity C-reactive protein. *Clin Chem* 49:611–616, 2003.
- 146-Grunstein R, Wilcox I, Yang TS, Gould Y, Hedner J. Snoring and sleep apnoea in men: association with central obesity and hypertension. *Int J Obes Relat Metab Disord* 17:533–40, 1993
- 147-Svatikova A, Wolk R, Gami AS, Pohanka M, Somers VK. Interactions between obstructive sleep apnea and the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 5:53–8, 2005.
- 148-Devouassoux G, Levy P, Rossini E, Pin I, Fior-Gozlan M, Henry M, Seigneurin D, Pepin JL. Sleep apnea is associated with bronchial inflammation and continuous positive airway pressure-induced airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 119:597–603, 2007.
- 149- Alam I, Lewis K, Stephens JW, Baxter JN. Obesity, metabolic syndrome and sleep apnoea: all pro-inflammatory states. *Obes Rev* 8:119–27, 2007
- 150-Entzian P, Linnemann K, Schlaak M, Zabel P. Obstructive sleep apnea syndrome and circadian rhythms of hormones and cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 153:1080–6, 1996.
- 151- Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Phenotypic and functional characterization of blood γδ T cells in sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 242–249, 2003.
- 152-Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Predictors of elevated nuclear factor-κB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 824–830, 2006.

- 153-Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, Oda N, Minoguchi H, Yoshino G, Hirano T, Adachi M. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation* 107:1129-1134, 2003
- 154-Ciftci TU, Kokturk O, Bukan N, Bilgihan A. The relationship between serum cytokine levels with obesity and obstructive sleep apnea syndrome. *Cytokine* 28:87-91, 2004
- 155-Muraki I, Tanigawa T, Yamagishi K, Sakurai S, Ohira T, Imano H, Kitamura A, Kiyama M, Sato S, Shimamoto T, Konishi M, Iso H, 2010. Nocturnal intermittent hypoxia and C reactive protein among middle-aged community residents: a cross-sectional survey. *Thorax* 65:523–527.
- 156-Yao M, Tachibana N, Okura M, Ikeda A, Tanigawa T, Yamagishi K, Sato S, Shimamoto T, Iso H. The relationship between sleep-disordered breathing and high-sensitivity C-reactive protein in Japanese men. *Sleep* 29:661–665, 2006
- 157- Ryan S, Nolan GM, Hannigan E, Cunningham S, Taylor C, McNicholas WT. Cardiovascular risk markers in obstructive sleep apnoea syndrome and correlation with obesity. *Thorax* 62:509–514, 2007.
- 158-Can M, Açıkgöz S, Mungan G, Bayraktaroğlu T, Koçak E, Güven B, Demirtas S. Serum cardiovascular risk factors in obstructive sleep apnea. *Chest* 129(2):233-7, 2006.
- 159-Haase VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:F1-F13, 2010.
- 160- Piperno A, Galimberti S, Mariani R, Pelucchi S, Ravasi G, Lombardi C, Bilo G, Revera M, Giuliano A, Faini A, Mainini V, Westerman M, Ganz T, Valsecchi MG, Mancia G, Parati G. Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: Data from the HIGHCARE project. *Blood* 117:2953–2959, 2011.

- 161- b- Calvin AD, Somers VK, Steensma DP, Rio Perez JA, van der Walt C, Fitz-Gibbon JM, Scott CG, Olson LJ. Advanced heart failure and nocturnal hypoxaemia due to central sleep apnoea are associated with increased serum erythropoietin. *Eur J Heart Fail* 12(4):354-359, 2010.
- 162-Koistinen PO, Rusko H, Irjala K, Rajamäki A, Penttinen K, Sarparanta VP, Karpakka J, Leppäluoto J. EPO, red cells, and serum transferrin receptor in continuous and intermittent hypoxia. *Med Sci Sports Exerc* 32(4):800-4, 2000.
- 163-16- Liu Q, Davidoff O, Niss K, Haase VH. Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *J Clin Invest* 3;122(12):4635-44, 2012.
- 164- Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab* 9(3):217–227, 2009.
- 165-Hämäläinen P, Saltevo J, Kautiainen H, Mäntyselkä P, Vanhala M. Erythropoietin, ferritin, haptoglobin, hemoglobin and transferrin receptor in metabolic syndrome: a case control study. *Cardiovasc Diabetol* 27;11:116, 2012.
- 166- McMahon S, Grondin F, McDonald PP, Richard DE, Dubois CM. Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. *J Biol Chem* 280: 6561-6569, 2005.
- 167-Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis 2008 15;111(2):924-31, 2008.
- 168- Malyszko J, Malyszko JS, Levin-Iaina N, Koc-Zorawska E, Kozminski P, Mysliwiec M. Is hemojuvelin a possible new player in iron metabolism in hemodialysis patients? *Int Urol Nephrol* 44(6):1805-11, 2012.

## 8. EKLER

### Ek 1. Etik Kurul Onayı



T.C.  
**ZONGULDAK KARAELEMAS ÜNİVERSİTESİ**  
**Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı**

20

TOPLANTI TARİHİ : 28/03/2012  
TOPLANTI NO : 2012/07

#### KARARLAR :

- 2- ZKÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Berrak GÜVEN'in sorumluluğunda yapılacak olan 2012-34-06/03 Protokol no'lu "Obstrüktif Uyku Apne Sendromunda Demir Metabolizmasının Değerlendirilmesi" konulu çalışmanın Etik Kurallara uygunluğuna,

Oy birliği ile karar verilmiştir.

A S L I G İ B İ D İ R

Doç. Dr. Banu DOĞAN GÜN  
ZKÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı