

ارزیابی هپسیدین پلاسما به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص پنومونی

رضا اسدزاده^{۱*}، کاوه عظیم زاده^۲، اکبر عباسی^۳، حامد امینی^۱

(۱) گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، ایران

(۲) گروه دام پزشکی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، ایران

(۳) گروه دام پزشکی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۱

چکیده

مقدمه: سنتز هپسیدین در کبد توسط سیتوکین های التهابی و افزایش بار آهن تحریک می شود. هپسیدین یک پپتید ضد میکروبی است که در بسیاری از بیماری ها به عنوان یک مارکر التهابی تلقی می گردد. این مطالعه تلاش دارد تا سطوح پلاسمایی هپسیدین را در افراد مبتلا به پنومونی که یک بیماری التهابی می باشد، تعیین و در صورت امکان آن را به عنوان یک روش تشخیصی مطمئن معرفی نماید.

مواد و روش ها: در این بررسی ۳۰ فرد مبتلا به پنومونی و ۲۰ فرد سالم حضور داشتند. سطوح پلاسمایی هپسیدین، اینترلوکین-۶ (IL-6) و فریتین با استفاده از روش الایزا مورد بررسی قرار گرفتند و سطوح آهن پلاسما نیز با استفاده از یک روش اسپکتروفتومتری سنجش شد. نتایج با استفاده از آزمون t-test و ROC Curve و آزمون همبستگی با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته های پژوهش: سطوح پلاسمایی هپسیدین، IL-6 و فریتین در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان داد ($P<0.0001$). در گروه بیمار بین هپسیدین با IL-6 ($P<0.0001$, $r=0.807$) و فریتین ($P<0.0001$, $r=0.718$) یک همبستگی مثبت آماری مشاهده گردید ولی بین غلظت پلاسمایی هپسیدین و آهن یک همبستگی منفی آماری وجود داشت ($P<0.0001$, $r=-0.679$). مساحت زیر منحنی (AUC)، میزان حساسیت و ویژگی تشخیصی هپسیدین در پنومونی به ترتیب برابر ۱، ۹۶/۷-۹۰ درصد و ۱۰۰ درصد بود. سطوح هپسیدین در افراد دارای نشت ریوی و تب دچار افزایش شده بود.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده، سطوح هپسیدین پلاسما از حساسیت و ویژگی خوبی برای تشخیص پنومونی برخوردار می باشد و می توان از آن به عنوان یک مارکر تشخیصی دقیق برای این بیماری استفاده نمود.

واژه های کلیدی: پنومونی، هپسیدین، آهن، فریتین، اینترلوکین-۶ (IL-6)

*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، ایران

Email: rezaasadzade40@yahoo.com

مقدمه

پنومونی یا عفونت حاد پارانشیم ریه در اغلب موارد توسط عوامل باکتریایی و ویروسی ایجاد می شود ولی عامل ایجاد کننده این بیماری اکثراً قابل تشخیص نیست (۱،۲). شیوع سالانه پنومونی در کشورهای در حال توسعه ۰/۲۹ درصد است و سالانه ۱۵۰/۷ میلیون مورد جدید و ۲۰-۱۱ میلیون مورد شدید که نیاز به بستری پیدا می کنند گزارش شده است (۱،۳). در این بیماری، عفونت و آسیب بافتی باعث فراخوانی سلول های درگیر در التهاب مثل ماکروفاژها به محل آسیب می شود (۴). التهاب و آسیب بافتی، ترشح سیتوکین های موضعی از این سلول ها را القاء و همین امر باعث به وجود آمدن یک پاسخ فاز حاد می گردد (۷-۵). از جمله این سیتوکین های التهابی، اینترلوکین-۶ (IL-6) در انسان و IL-6 و IL-1 α و IL-1 β در موش می باشند که توسط ماکروفاژها تولید می شوند (۸). در یک بررسی بر روی موش های آلوده شده با استرپتوکوکوس پنومونیه افزایش شدید IL-6 و IL-1 β گزارش شد (۹،۱۰). این سیتوکین ها باعث فعال شدن مسیر JAK-STAT شده و بعد از فسفریلاسیون STAT به وسیله JAK، STAT به پروموتور هپسیدین متصل و رونویسی از ژن هپسیدین را افزایش می دهد. دیگر سیتوکین های التهابی مثل فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α) و محصولات میکروبی نیز ممکن است باعث فعال شدن رونویسی ژن هپسیدین گردند (۱۰). پارک و همکاران در طی بررسی ویژگی های ضد میکروبی مایعات مختلف بدن انسان، توانستند پپتید کوچکی را از ادرار انسان جداسازی و بر اساس جایگاه سنتز (کبد: hep) و ویژگی ضد باکتریایی آن در بدن (cidin) به نام هپسیدین نام گذاری نمایند (۱۱). کرائوس و همکاران نیز توانستند همان پپتید را از پلاسما جداسازی و LEAP-1 (Liver-Expressed Antimicrobial Peptid) بنامند (۱۲). هپسیدین پپتید کوچک و کاتیونیک ۲۵ اسید آمینه ای، به شکل سنجاق سر، با دو صفحه β -sheet و دارای ۴ پیوند دی سولفیدی درون مولکولی می باشد و فرم غالب و فعال آن در سرم و مایعات بیولوژیکی به شکل هپسیدین-۲۵ است که از ۲۵ اسید آمینه تشکیل شده است (۱۳). این

پپتید عملکرد تنظیمی خود را با خنثی سازی عملکرد فروپورتین که در سطح ماکروفاژها، هپاتوسیت ها و انتروسیت ها بیان می شود اعمال می کند و از این طریق باعث افزایش ذخایر آهن داخل سلولی، کاهش جذب آهن مواد غذایی و کاهش غلظت آهن گردش خون می گردد. علاوه بر نقش تنظیمی در متابولیسم آهن، هپسیدین با تغییر مسیر پاسخ های التهابی و کاهش میزان آهن در دسترس میکروب ها نقش ضد میکروبی خود را ایفا می کند (۱۶-۱۴). فعالیت ضد باکتریایی (اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس) و ضد قارچی (کاندیدا آلبیکنس، آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فومیگاتوس) هپسیدین در بسیاری از مطالعات به اثبات رسیده است (۱۷،۱۱). به طور کلی بیان کبدی هپسیدین توسط دو سیگنال افزایش بار آهن و تولید محرک های التهابی مثل IL-6، IL-1 و لیپولی ساکاریدها افزایش پیدا می کند (۱۴).

تشخیص بیماری پنومونی تنها بر پایه بررسی های کلینیکی و رادیولوژیکی استوار می باشد (۱۸،۲۰). ولی نشانه های بالینی بیماری پنومونی بسیار متغیر بوده و تشخیص بر اساس آن ها بسیار سخت است و حتی گاهی ممکن است برخی علائم غیر ریوی مثل درد شکم، اختلال هوشیاری و سر درد نیز در این بیماری بروز پدیدار شوند که تشخیص اصلی را پنهان می کنند (۱). سرفه در ۸۰ درصد موارد وجود دارد اما در افراد مسن یا کسانی که توانایی تولید سرفه را ندارند ممکن است دیده نشود (۱۹). هم چنین در افراد مسن، همراهی بیماری با تب و لکوسیتوز کمتر دیده می شود (۲۰). در بررسی صورت گرفته توسط جعفری و همکاران، سرفه شایع ترین علامت بالینی بود ولی در افراد مسن این علامت جای خود را به تب داده بود (۲۱). هم چنین برخی بررسی ها نیز نشان داده اند که تصاویر گرافی سینه، روش کشت خون و کشت خلط فاقد کارایی لازم برای تشخیص پنومونی می باشند و مصرف مقادیر ناچیز آنتی بیوتیک و یا آلودگی نمونه خلط به بزاق که مشکل عمده این روش ها می باشند می تواند نتیجه این روش های تشخیصی را تحت تاثیر قرار دهد (۲۲،۱). با توجه به این که بسیاری از مطالعات، پنومونی را به عنوان یک بیماری التهابی

معرفی (۱،۹) و کاهش سطح آهن (۶) و افزایش سطوح سیتوکین های التهابی مثل IL-6 (محرک اصلی تولید هپسیدین (۱۴)) را در این بیماری گزارش نموده اند (۴،۹)، ما بر آن شدیم تا میزان تغییرات پلاسمایی هپسیدین را در افراد مبتلا به پنومونی مورد بررسی قرار دهیم و در صورت امکان آن را به عنوان یک مارکر تشخیصی برای این بیماری معرفی نمائیم، زیرا یک روش آزمایشگاهی مناسب و مطمئن برای تشخیص پنومونی وجود ندارد و بسیاری از مطالعات صورت گرفته درباره هپسیدین نیز، حساسیت و ویژگی تشخیصی هپسیدین برای بیماری پنومونی را گزارش نموده اند و مطالعات کافی درباره تغییرات پلاسمایی هپسیدین در بیماران مبتلا به پنومونی وجود ندارد. در نتیجه این مطالعه تلاش دارد تا سطوح پلاسمایی هپسیدین را در افراد مبتلا به پنومونی که یک بیماری التهابی می باشد، تعیین و در صورت امکان آن را به عنوان یک روش تشخیصی مطمئن معرفی نماید.

مواد و روش ها

این مطالعه از دو گروه تشکیل شده است: ۱) بیماران مبتلا به پنومونی (۲) گروه کنترل که شامل افراد سالم می باشد. طی پرسش نامه ای، افراد مبتلا به دیابت، ایدز، بیماری کبدی، فقر آهن، تحت درمان با دیالیز، دارای سابقه برای بیمارهای ریوی، مصرف کننده مواد الکلی و سیگار و افرادی که دارای سابقه مصرف قرص های آهن در ۳ ماه اخیر بودند از روند مطالعه حذف و از افراد واجد شرایط، رضایت نامه برای ورود به روند مطالعه اخذ گردید. گروه بیماران مبتلا به پنومونی از ۱۸ خانم و ۱۲ آقا و گروه کنترل نیز از ۱۲ خانم و ۸ آقا تشکیل شده بود. میانگین سنی ($\pm$ mean Standard Error) گروه اول برابر با $48/77 \pm 2/54$ سال و میانگین سنی گروه کنترل برابر با $45/3 \pm 3/26$ سال بود. افراد مبتلا به پنومونی بر اساس وجود علائم و نشانه های عفونت دستگاه تنفسی تحتانی و وجود ارتشاح ریوی به نفع پنومونی در گرافی قفسه سینه توسط پزشک معالج و متخصص رادیولوژیست تشخیص داده شدند. نمونه های خونی گرفته شده از افراد بیمار و سالم در لوله های هپارینه، جهت جداسازی پلاسما در دمای اتاق در دور ۴۰۰۰RPM به مدت ۵

دقیقه سانتریفوژ و پلاسما تا زمان انجام بررسی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد منجمد شد. هپسیدین پلاسما بر اساس کیت اندازه گیری هپسیدین شرکت Bioassay Technology Laboratory کشور چین، IL-6 بر اساس کیت اندازه گیری IL-6 شرکت Koma Biotech و فریتین پلاسما نیز به کمک کیت شرکت Diagnostics Biochem کانادا و به روش الایزای ساندویچی (Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Sandwich ELISA) (MPW4, Hiperion) مورد سنجش قرار گرفت. حساسیت روش مذکور برای هپسیدین، IL-6 و فریتین به ترتیب برابر $6/15$ پیکوگرم در میلی لیتر، $8/2$ پیکوگرم در میلی لیتر و $7/35$ نانوگرم در میلی لیتر بود. آهن پلاسما نیز به روش اسپکتروفتومتریک (UV/Visible, Shekel 1500, Germany) و بر اساس کیت شرکت Parsazmun ایران مورد سنجش قرار گرفت. حساسیت روش به کار برده شده بر اساس کیت برابر ۲ میکروگرم در دسی لیتر بود. بررسی های آماری نیز توسط نرم افزار SPSS vol.17 و آزمون t-test و ROC Curve و نیز آزمون همبستگی صورت گرفت. سطح معنی داری $P < 0.01$ در نظر گرفته شد.

از آزمون ROC Curve برای تعیین قدرت یک روش در تشخیص یک بیماری استفاده می شود و هر گاه تست قادر به تشخیص دقیق و بی نقص باشد، آن گاه مقادیر آن برای افراد سالم جمعیت پایین و برای افراد بیمار بالا خواهد بود (یا برعکس بسته به وضعیت بیماری). هر چه قدرت تشخیص تست بیشتر باشد، منحنی ROC بالای قطر مربع و به حالت ایده آل (مساحت برابر با یک) نزدیک تر خواهد بود. در منحنی ROC آزمونی که فاقد قدرت تشخیص باشد، بر قطر مربع منطبق خواهد بود (۱).

یافته های پژوهش

جدول شماره ۱ نشان دهنده شیوع برخی علائم بالینی در گروه بیمار می باشد. تب شایع ترین علامت بالینی بود. در بررسی تصویر گرافی سینه افراد بیمار نیز، ۱۰۰ درصد افراد دارای ارتشاح ریوی بودند. نتایج حاصل از آزمون t-test بر اساس میانگین ($\pm$ Mean SE) ارائه شده اند. گروه بیمار افزایش معنی دار غلظت

پلاسمایی هپسیدین را نسبت به گروه کنترل نشان داد، به طوری که این مقدار از $69/67 \pm 4/92$ پیکو گرم در میلی لیتر در گروه کنترل به $313/40 \pm 17/72$ پیکو گرم در میلی لیتر در گروه بیمار رسید ($P < 0.0001$). مقادیر IL-6 نیز در افراد بیمار افزایش معنی داری را نشان داد و از $58/75 \pm 4/01$ پیکو گرم در میلی لیتر در گروه کنترل به $115/20 \pm 3/82$ پیکو گرم در میلی لیتر در گروه بیماران رسید ($P < 0.0001$). میانگین فریتین پلاسما نیز از $74/45 \pm 2/73$ نانو گرم در میلی لیتر در افراد کنترل به $117/30 \pm 2/59$ نانو گرم در افراد مبتلا به پنومونی رسید و این افزایش به صورت معنی دار بود ($P < 0.0001$). سطوح پلاسمایی آهن در افراد بیمار دچار یک کاهش معنی دار شد و از $103 \pm 3/68$ میکروگرم در دسی لیتر در افراد کنترل به $75/93 \pm 2/28$ میکروگرم در دسی لیتر در افراد بیمار رسید ($P < 0.0001$). در افراد بیمار بین مقادیر پلاسمایی هپسیدین با سطوح پلاسمایی IL-6 ($P < 0.0001$)، فریتین ($r: 0.807$) (نمودار شماره ۱) و $r: 0.718$ (نمودار شماره ۲) یک همبستگی مثبت آماری و بین سطوح پلاسمایی هپسیدین با سطوح آهن پلاسما نیز یک همبستگی منفی معنی دار ($P < 0.0001$)، $r: -0.679$ (نمودار شماره ۳) را شاهد بودیم. هم چنین تجزیه و تحلیل داده های به دست آمده نشان داد که بین سطوح فریتین و آهن پلاسما یک همبستگی منفی معنی دار برقرار است ($P < 0.0001$, $r: -0.535$). میزان هپسیدین بین هر دو جنس در گروه های کنترل ($P > 0.335$) و بیمار ($P > 0.398$) اختلاف معنی داری را نشان نداد. این میزان در گروه کنترل برای

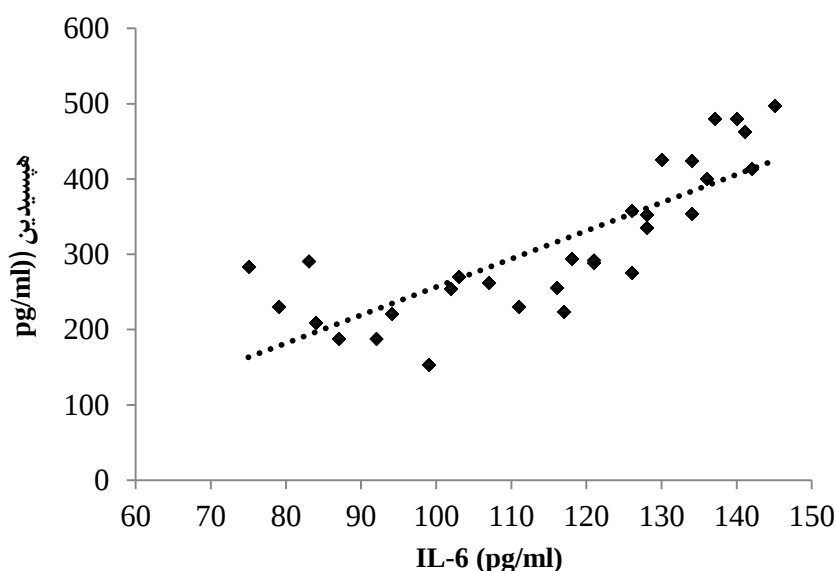
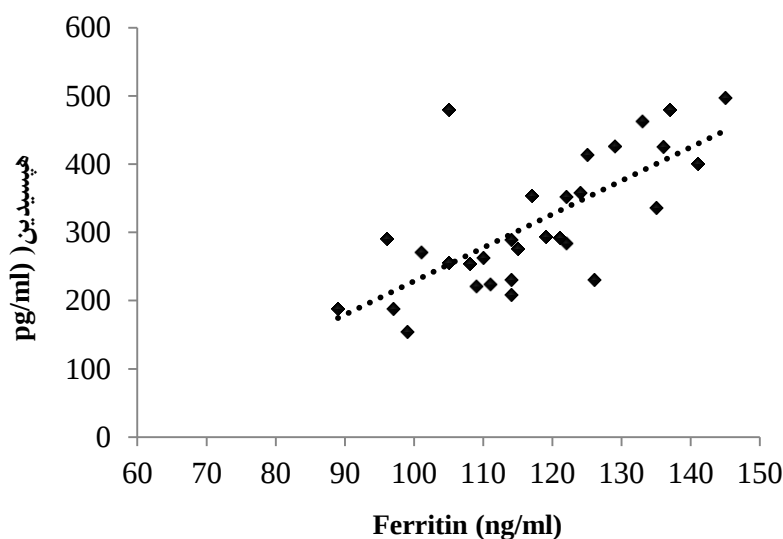
خانم ها $73/65 \pm 6$ پیکوگرم در میلی لیتر و برای آقایان $63/68 \pm 8/45$ پیکوگرم در میلی لیتر بود. در گروه بیماران نیز سطوح پلاسمایی هپسیدین برای مردان $294/66 \pm 25/50$ پیکوگرم در میلی لیتر و برای زنان $325/88 \pm 24/28$ پیکوگرم در میلی لیتر مشاهده گردید (نمودار شماره ۴). هم چنین با بررسی میزان همبستگی بین غلظت پلاسمایی هپسیدین و افزایش سن در هر دو گروه بیمار ($P < 0.360$, $r: 0.173$) و کنترل ($P < 0.618$, $r: 0.119$) شاهد عدم وجود همبستگی آماری معنی دار بودیم. جدول شماره ۲ نیز نتایج حاصل از آزمون های t-test و ROC Curve را به طور خلاصه نشان می دهد. نتایج حاصل از آزمون ROC Curve نشان می دهد که هپسیدین برای تشخیص پنومونی به ترتیب دارای میزان حساسیت و ویژگی برابر با $96/7$ و 90 درصد می باشد. مساحت زیر منحنی (AUC) و احتمال مربوط نیز در جدول شماره ۲ و نمودار شماره ۵ آورده شده است. نقطه برش (Cut off point) برای هپسیدین در این بیماری با توجه به میانگین های به دست آمده برای دو گروه بیمار و کنترل برابر $191/53$ پیکوگرم در میلی لیتر می باشد. بر اساس درصد به دست آمده برای حساسیت، $96/7$ درصد داده های مربوط به گروه بیماران، دارای مقادیری بیشتر از نقطه برش می باشند و این میزان درصد برای حساسیت و هم چنین مساحت زیر منحنی برابر با عدد یک، نشان می دهد که این تست از توانایی بسیار بالایی برای تشخیص پنومونی برخوردار می باشد.

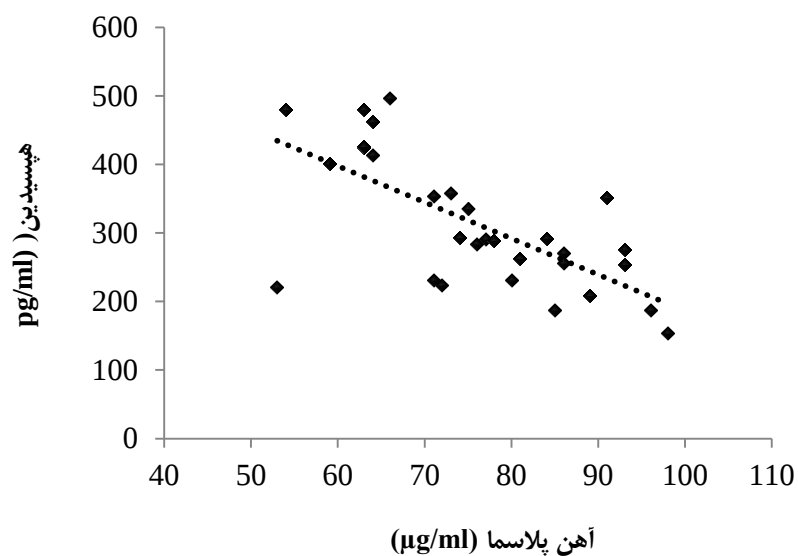
جدول شماره ۱. علائم بالینی در گروه بیماران مبتلا به پنومونی

علائم	تعداد (%)
سرفه	۲۶ (۸۶/۶۶ %)
دفع خلط	۲۲ (۷۳/۳۳ %)
تب	۲۸ (۹۳/۳۳ %)
درد قفسه صدی	۸ (۲۶/۶۶ %)
اختلال هوشیاری	۲ (۶/۶۶ %)

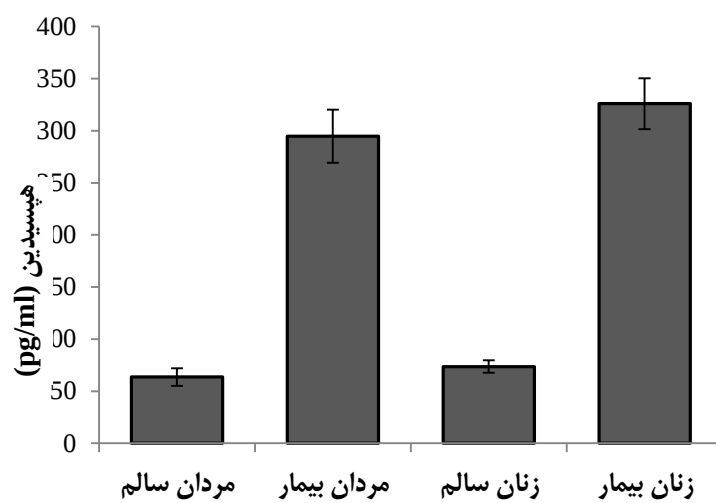
جدول شماره ۲. نتایج حاصل از آزمون های t-test و ROC Curve

گروه	تعداد	میانگین (pg/ml)	AUC	P	Sensitivity(%)	Specificity(%)
بیمار	۳۰	$313/40 \pm 17/72^*$	۱	۰/۰۰۰۱	۹۰-۹۶/۷	۱۰۰
کنترل	۲۰	$69/67 \pm 4/92^*$	-	-	-	-

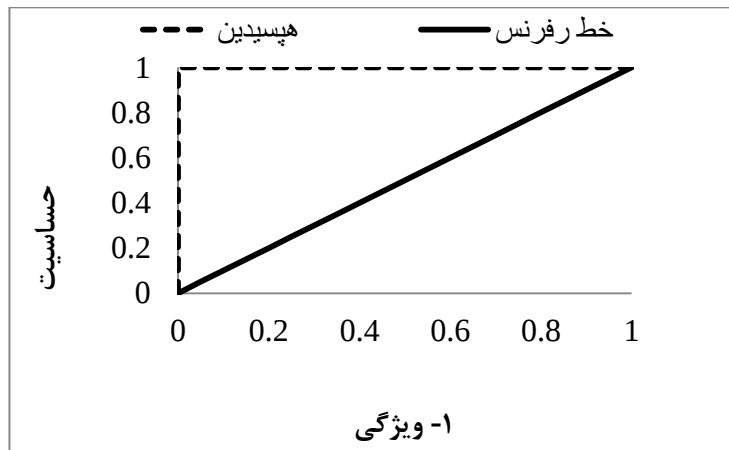
*دو گروه دارای اختلاف آماری معنی دار می باشند ($P < 0.0001$)نمودار شماره ۱. همبستگی بین هپسیدین و اینترلوکین-۶ ($P < 0.0001$, $r: 0.807$)نمودار شماره ۲. همبستگی بین هپسیدین و فریتین پلاسما ($P < 0.0001$, $r: 0.718$)



نمودار شماره ۳. همبستگی بین هپسیدین و آهن پلاسما ($P < 0.0001$, $r = -0.679$)



نمودار شماره ۴. میزان هپسیدین پلاسما در دو گروه خانم ها و آقایان



نمودار شماره ۵. نمودار ROC برای هپسیدین: ناحیه زیر منحنی برابر ۱ می باشد.

بحث و نتیجه گیری

باکتری ها و دیگر عوامل بیماری زا برای افزایش توان بیماری زایی خود محدوده ای از عوامل ویروالانس را تولید می کنند که اکثر آن ها به وسیله فاکتورهای محیطی تنظیم می شوند. سطوح آهن نیز یکی از فاکتورهای مهم در این باره می باشد که به طور بسیار نزدیکی با سنتز برخی از عوامل ویروالانس در ارتباط می باشد (۲۳). افرادی که سطوح آهن بالایی دارند، به تعدادی از عوامل بیماری زا حساس می باشند (۱۷، ۱۳). در بررسی انجام شده توسط ماسائیس و همکاران بر روی افراد مبتلا به ایدز که دارای جهش در ژن کد کننده فروپوریتین (SLC40A1)(Q248H) بودند سطوح پایین هپسیدین و سطوح بالای فریتین مشاهده شد. این افراد به طور معنی داری شیوع بالایی از توپرکلوزیس ریوی و پنومونی Pneumocystis jiroveci را نسبت به افراد فاقد این جهش نشان دادند و این امر می تواند به دلیل افزایش دسترسی این ارگانیسم ها به آهن باشد. وی دلیل کاهش سطوح هپسیدین پلاسما در پاسخ به عفونت ایجاد شده (که در تضاد با نتایج مطالعه حاضر می باشد) را نقص در تحریک تولید هپسیدین توسط سلول های مسئول در روند التهاب و کمبود فاکتورهایی مثل IL-6 و $TNF-\alpha$ ذکر کرد، زیرا بیماری ایدز باعث کاهش تعداد سلول های سیستم ایمنی و تولید سیتوکین ها می گردد (۲۴). افزایش سطوح هپسیدین پلاسمایی در افراد بیمار به عنوان یک مکانیسم دفاعی بدن برای کاهش دسترسی

عوامل بیماری زا به آهن شناخته می شود (۲۵) و بسیاری از مطالعات نیز نشان داده اند که بین افزایش سطوح IL-6 و IL-1 با افزایش سطوح هپسیدین یک رابطه مثبت معنی دار برقرار است و از این رو هپسیدین را به عنوان یک پروتئین فاز حاد نوع II معرفی می کنند (۲۷، ۲۶، ۱۵، ۱۰).

امروزه مطالعات زیادی با هدف معرفی هپسیدین به عنوان یک مارکر تشخیصی برای بیماری ها در حال انجام شدن هستند. تان و همکاران در سال ۲۰۱۲ تلاش کردند تا از نسبت هپسیدین به فریتین به عنوان یک مارکر تشخیصی برای تشخیص سیروز کبدی استفاده کنند (۲۸). در یک مطالعه دیگر نیز از هپسیدین به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص شدت التهاب صفراوی استفاده شد (۲۹). چریان و همکاران از هپسیدین برای تشخیص و تمایز عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری از عفونت ناشی از کرم روده در کودکان استفاده کردند (۳۰). در مطالعه Wu و همکاران در سال ۲۰۱۳ تلاش کردن تا هپسیدین سرم را به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص سپسیس نوزادان با وزن کم معرفی نمایند (۳۱). مقادیر هپسیدین حتی در صورت عدم وجود پاسخ فاز حاد قابل قبول نیز افزایش می یابد و همین ویژگی آن را مستعد می سازد تا به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص بیماری ها، مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد (۳۲، ۳۳). در یک بررسی بر روی افراد مبتلا به بیماری مالاریا که دارای تب بدون

علامت بودند مشخص شد که علی رغم عدم وجود پاسخ فاز حاد قابل قبول، سطوح هپسیدین دچار افزایش شده است (۳۲). در این مطالعه سطوح هپسیدین پلاسما در بیماری پنومونی مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی صورت پذیرفته بر روی افراد مبتلا به پنومونی شاهد افزایش معنی دار سطوح پلاسمایی هپسیدین، IL-6 و فریتین و کاهش معنی دار آهن پلاسما نسبت به گروه کنترل بودیم ($P < 0.0001$). توموسوگی و همکاران نیز شاهد افزایش مقادیر هپسیدین در افراد مبتلا به بیماری های التهابی مثل پنومونی، سپسیس و پیلونفریت بودند. آن ها ثابت نمودند که افزایش مقادیر هپسیدین به دلیل افزایش سطوح IL-6 سرم می باشد (۲۶). روه و همکاران نیز نشان دادند که بین سطوح هپسیدین پلاسما و جذب آهن یک رابطه منفی و بین هپسیدین و فریتین پلاسما یک رابطه مثبت معنی دار معنی دار وجود دارد. آن ها گزارش نمودند که با افزایش سطوح هپسیدین، غلظت فریتین پلاسما افزایش و میزان جذب آهن کاهش می یابد (۳۴). پورناوان و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ توانستند نشان دهند که در کودکان مبتلا به پنومونی غلظت آهن سرم کاهش می یابد و بین سطوح پروتئین واکنشی C و سطوح آهن این افراد یک ارتباط منفی معنی دار برقرار است (۶). این مطالعه نیز توانست همبستگی مثبت معنی دار هپسیدین با IL-6 ($P < 0.0001$, $r: 0.807$) (نمودار شماره ۱)، هپسیدین با فریتین ($P < 0.0001$, $r: 0.718$) (نمودار شماره ۲) و همبستگی منفی معنی دار بین هپسیدین با آهن پلاسما ($P < 0.0001$, $r: -0.679$) (نمودار شماره ۳) و فریتین با آهن پلاسما ($P < 0.002$, $r: -0.535$) را نشان دهد. لوکون و پونون گزارش نمودند که بین غلظت هپسیدین زنان و مردان هیچ اختلاف آماری معنی داری وجود ندارد. آن ها بیان کردند که غلظت هپسیدین به ترتیب برای زنان و مردان سالم برابر ۲۵۴ نانو گرم در میلی لیتر و ۲۲۷ نانو گرم در میلی لیتر می باشد (۳۵). در این مطالعه نیز میزان هپسیدین بین هر دو جنس در گروه های کنترل ($P > 0.335$) و تیمار ($P > 0.398$) اختلاف معنی داری را نشان نداد. این میزان در گروه کنترل برای خانم ها $73/65 \pm 6$ پیکو گرم در میلی لیتر و برای آقایان $63/68 \pm 8/45$ پیکو گرم در میلی لیتر

بود. در گروه بیماران نیز سطوح پلاسمایی هپسیدین برای مردان $294/66 \pm 25/50$ پیکو گرم در میلی لیتر و برای زنان $325/88 \pm 24/28$ پیکو گرم در میلی لیتر مشاهده گردید (نمودار شماره ۴). هم چنین نتایج حاصل از این مطالعه، در هر دو گروه کنترل ($P > 0.618$) هیچ ($r: 0.119$) و بیمار ($r: 0.173$, $P > 0.360$) همبستگی آماری معنی داری را بین مقادیر پلاسمایی هپسیدین و افزایش سن نشان نداد. لی و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که سطوح هپسیدین با افزایش سن افزایش نمی یابد (۳۶).

در مطالعه حاضر نتایج حاصل از آزمون ROC Curve نشان می دهد که هپسیدین برای تشخیص پنومونی یک مارکر با حساسیت و ویژگی بسیار عالی می باشد که حتی مساحت زیر منحنی برای آن نیز برابر با عدد یک می باشد (نمودار شماره ۵). نقطه برش برای این بیماری برابر با $191/53$ پیکو گرم در میلی لیتر تعیین گردید که اکثر داده های بیماران در بالا و داده های افراد سالم در زیر این نقطه قرار گرفتند. میزان حساسیت و ویژگی هپسیدین برای تشخیص پنومونی به ترتیب برابر $96/7$ - 90 و 100 درصد بود و این نتایج نشان می دهند که این آزمون قادر به تشخیص افراد بیمار از افراد سالم در یک سطح بسیار عالی می باشد. به عنوان برخی از مزیت های روش اندازه گیری هپسیدین پلاسما می توان به نمونه گیری آسان و غیر تهاجمی بودن روش (بیشتر نمونه های خلط آلوده به بزاق می باشند که از ارزش نمونه می کاهد)، قابلیت تکرارپذیری، مدت زمان کم انجام پذیری در مقابل روش هایی چون کشت میکروبی (حداقل ۴۸ ساعت)، و اطمینان بیشتر نسبت به روش کشت اشاره کرد. برخی مطالعاتی گزارش نموده اند که تصاویر گرافی سینه، روش کشت خون و کشت خلط فاقد کارایی لازم برای تشخیص پنومونی می باشند. بر اساس این مطالعات، ارتشاح ریوی مشاهده شده در تصویر گرافی سینه تنها در 57 - 36 درصد بیماران مشاهده می گردد (۱،۲۲). رنگ آمیزی و کشت خلط نیز تنها زمانی می تواند مفید باشد که یک نمونه مناسب، بدون آلودگی به بزاق، به مقدار لازم و قبل از درمان آنتی بیوتیکی تهیه شود (۱،۲۲). نتایج به دست آمده از کشت خلط افراد

مبتلا به پنومونی نیز متنوع بوده و در محدوده ۷۹-۲۰ درصد قرار دارد (۲۲). کشت های خون بیماران بستری شده در بیمارستان نیز در ۱۸ درصد موارد مثبت بوده است (۱). در صورت مصرف آنتی بیوتیک، میزان موارد مثبت برای کشت خون به کمتر از ۵ درصد می رسد (۲۲). روش های کشت برای تشخیص پنومونی (به خصوص برای عوامل ویروسی) به صورت روتین انجام نمی پذیرند (۱، ۲۲) و این در حالی است که روش مورد بررسی در مطالعه حاضر را می توان در هر آزمایشگاه تشخیصی و در مدت زمانی کمتر نسبت به روش کشت انجام داد. برخی باکتری ها مدت زمان رشد متفاوتی را در روش کشت دارا می باشند. به عنوان مثال برای جداسازی لژیونلا پنوموفیلا مدت زمان انکوباسیونی بین ۵-۲ روز لازم است. هم چنین نیاز به محیط کشت انتخابی و غیر انتخابی برای رشد و تاثیر درمان آنتی

بیوتیکی در نتیجه کشت از معایب این روش می باشد (۳۷).

نتایج این بررسی نشان داد که مقادیر این مارکر در تمام موارد بستری شده در بیمارستان که دارای ارتشاح ریوی در تصویر گرافی سینه و تب بودند دچار افزایش شده و از یک حساسیت و ویژگی تشخیصی بسیار خوب برخوردار می باشد و به نظر می رسد، بتوان از آن به عنوان یک روش ساده و راحت آزمایشگاهی که تحت تاثیر عواملی مثل جنسیت و افزایش سن نیست، در کنار سایر روش های تشخیصی مثل گرافی سینه و وجود تب به کار برد ولی با وجود این، مطالعات بیشتر و گسترده تری لازم است تا کاربرد بالینی سنجش سطح هپسیدین در پنومونی به درستی شناخته شود.

References

1. Asadzadeh R, Azimzadeh K. [Assessment of serum total Sialic acid usage in diagnosing pneumonia]. *Sci J Ilam Uni Med Sci* 2014; 22:128-37. (Persian)
2. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze H, Hart G, Marth J, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. New York: Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2009.
3. Rudon I, Tomaskovic L, Boschi Pinto C, Compbell H. Global estimate of the incidence of clinical pneumonia among children under five years of age. *Bull World Health Org* 2004; 82:895-903.
4. Mizgerd JP, Skerrett SJ. Animal models of human pneumonia. *AJP Cell Mol Physiol* 2008; 294:387-98.
5. Guzel M, Askar TK, Kaya G, Atakisi E, Avci GE. Serum sialic acids, total antioxidant capacity, and adenosine deaminase activity in cattle with theileriosis and anaplasmosis. *Bull Vet Inst Pulawy* 2008; 52:227-30.
6. Purnawan ON, Subanada B, Mulatsih S. Correlation between C-reactive protein and serum iron levels in children with pneumonia. *Paediatrics Indones* 2012; 52:38-42.
7. Lindberg G, Eklund GA, Gullberg B. Serum sialic acid concentration and cardiovascular mortality. *BMJ* 1991; 302:143-6.
8. Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *PNAS* 2005; 102:1906-10.
9. Smith MW, Schmidt JE, Rehge JE, Orihuela CJ, McCullers JA. Induction of pro and anti inflammatory molecules in a mouse model of pneumococcal pneumonia after influenza. *Comp Med* 2007; 57:82-9.
10. Ganz T, Nemeth E. The Hepcidin ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematology* 2011; 46:538-42.
11. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; 276:7806-10.
12. Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann W, Schulzknapp P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000; 480:147-50.
13. Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003; 102:783-88.
14. Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo K, et al. Serum hepcidin level and erythropoietic activity after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2008; 93:1550-4.
15. Lauth X, Babon JJ, Stannard JA, Singh S, Nizet V, Carlberg JM, et al. Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and in vivo hepatic response to bacterial infections. *J Biol Chem* 2005; 280: 9272-82.
16. Dede S, Deger Y, Deger S, Tanrıtanır P. Plasma Levels of zinc, copper, copper/zinc ratio, and activity of carbonic anhydrase in equine piroplasmiasis. *Biol Trace Elem Res* 2008; 125:41-5.
17. Ashrafi H. Hepcidin the missing link between hemochromatosis and infections. *Infect Immun* 2003; 71:6693-700.
18. Karapehlivan M, Atakisi E, Citil M, Kankavi O, Atakisi O. Serum sialic acid levels in calves with pneumonia. *Vet Res Commun* 2007; 31:37-41.
19. Lamping DL, Schroter S, Marquis P, Marrel A, Dupratlomon I. The community acquired pneumonia symptom questionnaire a new patient based outcome measure to evaluate symptoms in patients with community acquired pneumonia. *Chest* 2002; 122:920-9.
20. Raul R, Antoni T. Community acquired Pneumonia in the elderly. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1908-14.
21. Jafari S, Soltanpour F, Soudbakhsh A, Safavi A, Rokni Yazdi H, Navipour R, et al. [Community acquired pneumonia a comparison between elderly and nonelderly patients]. *Tehran Univ Med J* 2006; 64:74-80. (Persian)
22. Skerrett SJ. Diagnostic testing for community acquired pneumonia. *Clin chest Med* 1999; 20: 531-48.
23. Sritharan M. Iron and bacterial virulence. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24:163-4.
24. Masaisa F, Breman C, Gahutu JB, Mukibi J, Delanghe J, Philippe J. Ferroportin (SLC40A1) Q248H mutation is associated with lower circulating serum

- hepcidin levels in Rwandese HIV-positive women. *Ann Hematol* 2012; 91:911-6.
25. Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurtsmoes AJ, Klaver SM, Kroot JJ, Tienoven DV, et al. Serum hepcidin reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood* 2011; 117: 218-25.
26. Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya H, Umehara H, et al. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using Protein Chip System. *Blood* 2006; 108: 1381-7.
27. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anaemia of inflammation is a type II acute phase protein. *Blood* 2003; 101: 2461-3.
28. Tan TCH, Crawford D, Franklin M, Jaskowski L, Macdonald GA, Jonsson J, et al. The serum hepcidin ferritin ratio is a potential biomarker for cirrhosis. *Liver Int* 2012; 32:1391-9.
29. Strnad P, Schwarz P, Rasenack MC, Kucukoglu O, Habib RI, Heuberger D, et al. Hepcidin is an antibacterial, stressinducible peptide of the biliary system. *Plos One* 2011; 6:6454.
30. Cherian S, Forbes DA, Cook AG, Sanfilippo FM, Kemm EH, Swinkels DW, et al. An insight into the relationships between hepcidin, anemia infections and inflammatory cytokines in pediatric refugees a cross-sectional study. *Plos One* 2008; 3:4030.
31. Wu TW, Tabangin M, Kusano R, Ma Y, Ridsdale R, Akinbi H. The utility of serum hepcidin as a biomarker for late-onset neonatal sepsis. *J Pediatrics* 2013; 162:67-71.
32. De Mast Q, Syafruddin D, Keijmel S, Riekerink TO, Deky O, Asih PB, et al. Increased serum hepcidin and alterations in blood iron parameters associated with asymptomatic *P. falciparum* and *P. vivax* malaria. *Haematologica* 2010; 95:1068-74.
33. Kossiva L, Soldatou A, Gourgiotis D, Stamati L, Tsentidis C. Serum hepcidin indication of its role as an acute phase marker in febrile children. *Italian J Pediatr* 2013; 39:25-30.
34. Roe MA, Collings R, Dainty JR, Swinkels DA, Fairweather SJ. Plasma hepcidin concentrations significantly predict interindividual variation in iron absorption in healthy men. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 1088-91.
35. Luukkonen S, Punnonen K. Serum pro-hepcidin concentrations and their responses to oral iron supplementation in healthy subjects manifest considerable inter individual variation. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44:1361-2.
36. Lee P, Gelbart T, Waalen J, Beutler E. The anemia of ageing is not associated with increased plasma hepcidin levels. *Blood Cell Mol Dis* 2008; 41:252-4.
37. Qasem JA, Mustafa AS, Khan ZU. Legionella in clinical specimens and hospital water supply facilities molecular detection and genotyping of the isolates. *Med Princ Pract* 2008; 17:49-55.

Assessment of Plasma Hecpidin as a Biomarker for Diagnosing Pneumonia

Asadzadeh R^{1*}, Azimzadeh K², Abasi A³, Amini H¹

(Received: April 11, 2015

Accepted: June 22, 2015)

Abstract

Introduction: The synthesis of hepcidin is greatly stimulated by inflammation or iron overload. Hecpidin is an antimicrobial peptide which is known to be as an inflammatory marker for many diseases. This study attempts to determine hepcidin levels in patients with pneumonia and introduce it as a perfect diagnostic marker for pneumonia.

Materials & methods: In this study, 30 patients with pneumonia and 20 healthy controls participated. Plasma hepcidin, Interleukin-6 (IL-6) and ferritin values were measured by Elisa method and plasma iron levels were also assayed by using a spectrophotometry method. Data were compared by using «t-test, ROC curve and Correlation test».

Findings: Plasma levels of hepcidin, IL-6 and ferritin in the patient group showed a significant increase compared to the control group ($p < 0.0001$). A significant positive

correlation was detected between hepcidin by IL-6 ($p < 0.0001$, $r: 0.807$) and ferritin concentrations ($p < 0.0001$, $r: 0.718$) in patient group, but there was a significant negative correlation between plasma hepcidin concentration and iron ($p < 0.0001$, $r: -0.679$). Area under ROC curve (AUC), diagnostic sensitivity and specificity of hepcidin for detection of pneumonia were 1, 90 – 96.7 % and 100%, respectively. Hecpidin values were increased in individuals by pulmonary infiltration and fever.

Discussion & Conclusion: According to the results, plasma hepcidin has good sensitivity and specificity for the diagnosis of pneumonia and it can be used as a perfect diagnostic biomarker for this disease.

Key words: Pneumonia, Hecpidin, Iron, Ferritin, Interleukin-6 (IL-6)

1. Dept of Cell and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University , Urmia Branch , Urmia, Iran

2. Dept of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University , Urmia Branch , Urmia, Iran

3. Dept of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University , Tabriz Branch , Tabriz, Iran

* Correspondin authorEmail: rezaasadzade40@yahoo.com