تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال سیزدهم
آذر - دی
۱۳۸۹
شماره ۶۹

هپسیدین چیست
و تحت چه شرایطی مورد اندازه گیری قرار می گیرد؟

لعیا تکبیری
گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

چکیده :

فاکتورتازه شتاخته شده ی "هپسیدین " یک پروتیین فاز حاد است که نقش مرکزی در متابولیسم آهن دارد. هپسیدین با بوستن به فروپروتیین و تخریب آن باعث مهار رها سازی آهن بداخل خون می شود. این پروتیین در کبد ساخته می شود و پس از انجام نقش فیزیولوژیک خود از طریق ادرار دفع میشود. تولید هپسیدین تحت تاثیر ذخایر آهن و التهاب افزایش می یابد، در حالیکه اریترو- پوئزو هیپوکسی اثر مهاری بر تولید آن دارند. روش های متعددی برای اندازه گیری این فاکتور مورد بررسی قرار گرفته است و انتظار می رود در آینده نزدیک انجام روتین آن امکان پذیر باشد.

تحقیقات متعددی در مورد ارزش تشخیصی این اندازه گیری طی اختلالات مختلف متابولیسم آهن در جریان است.

موکروماتوز ارثی شتاخته شده ترین بیماری است که با فقدان یا کاهش هپسیدین همراه است. در حالیکه گزارش ها گویای آن است که التهاب، برخی از کم خونی های همراه بیماری های مزمن کلیوی و آنمی ناشی ازالتهاب شایع ترین موارد افزایش هپسیدین هستند.

واژگان کلیدی: هپسیدین ، آهن

هپسیدین چیست؟

هپسیدین (hepcidin) یک فاکتور پپتیدی است که برای نخستین بار در سال ۲۰۰۱ مورد شناسایی قرار گرفت.هنگامیکه این فاکتور از پلاسما جدا شد، به « پپتید آنتی باکتریال بروز یافته در کبد» نامیده شد. ولی در همان زمان فاکتور فوق از ادرار نیز استخراج گشت و از آنجایی که منشا کبدی ودر عین حال اثرات باکتری کشی داشت هپسیدین نام گرفت. (شکل یک)(۱۰، ۱۹)

ژن هپسیدین انسانی بر روی بازوی q کروموزوم ۱۹ قرار گرفته و کد کننده یک پره پرو پروتیین ۸۴ اسید امیته ای می باشد.

این پروتیین پیش ساز طی انتقال داخل سیتوپلاسمی تحت تاثیر آنزیم ها شکسته و بعنوان یک پروتیین ۶۴ اسید امیته ای وارد شبکه آندوپلاسمیک می شود.

در مرحله بعدی یک آنزیم کانورتاز موجب جدا شدن ۳۹ اسید امیته دیگر از پروتیین می شود.

فراورده نهایی یک فاکتور فعال ۲۵ اسید امیته ایست که همان هپسیدین بالغ می باشد، و متصل به آلفا دو ماکروگلبولین در خون گردش می کند(۱۵).

جالب توجه این است که اخیرا ایزوفرم های ۲۲و ۲۰ اسید امیته ای از این فاکتور شناسایی شده اند. تفاوت این ایزوفرم ها در انتهایN می باشد و در حالی که مولکول ۲۰ اسید امیته ای همانند فاکتور اصلی هم در خون و هم در ادرار وجود دارد ، ظاهرا فاکتور ۲۲ اسید امیته ای فقط در ادرار حضور دارد.

از این رو به نظر می رسد فاکتور فوق صرفا یک متابولیت تخریب گشته از مولکول ۲۵ اسید امیته ای اصلی باشد.

نکته گفتنی دیگر: این که از آنجایی که تنها هپسیدین ۲۵ اسید امیته ای ، دارای فعالیت بیولوژیک است بنا بر این ۵ اسید امیته انتهای N پروتیین برای فعالیت آن اساسی هستند.(۱۰، ۱۹)

عملکردهپسیدین

نخستین یافته در مورد عملکرد هپسیدین ویژگی ضد باکتریایی آن بود. پژوهش های انجام گرفته در محیط خارج از بدن نشان داده اند ، که هپسیدین انسانی در غلظتی ده برابر غلظت فیزیو لوژیک آن دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی ست.

اما در مورد اینکه آیا هپسیدین می تواند در داخل بدن به چنین غلظتی برسدو اینکه آیا این فعالیت ضد میکروبی دارای اهمیت بیولوژیک هست یا نه شواهد کافی وجود ندارد.

در واقع بررسی های تازه بر نقش هپسیدین به عنوان حلقه مرکزی مکانیسم های تنظیم آهن بدن تاکید کرده انداز این روبهتر است در ابتدای بحث نگاهی داشته باشیم به متابولیسم آهن در بدن انسان.

متابولیسم آهن:

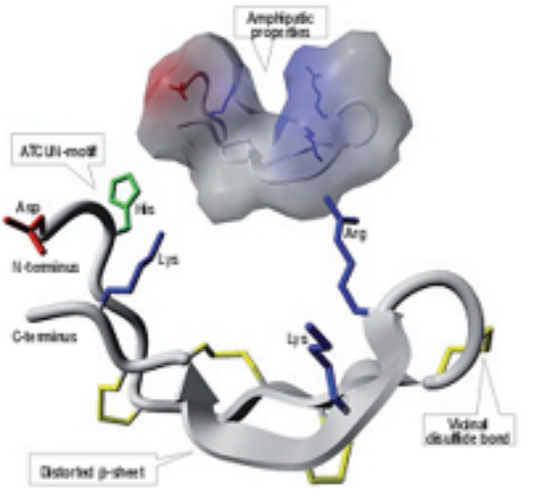
متابولیسم آهن بدن بر مبنای مکانیسم های کارایی ذخیره و باز جذب استوار گشته است. طوری که نیاز روزانه به جذب این فاکتور بسیار ناچیز است.

این مکانیسم ها از یک سوی آهن را از ذخایر آن به سمت مراکز خونسازی هدایت می کنند و از سوی دیگر آهن مورد استفاده قرار کرفته را بازیافت می نمایند.

بتابر این لازم است ارتباط مابین سلولهای ذخیره کننده و سلولهای مصرف کننده تحت تنظیم دقیق قرار گیرد.

سلول های ذخیره کننده اصلی برای آهن ماکروفاژ ها هستند . این سلول ها آهن موجود در کلبول های قرمز تخریب شده را بازیافت و نگهداری می کنند. مصرف عمده این فاکتور طی جریان خونسازی یا اریترو پوئز است.(۴،۱۰،۱۹)

قسمت دیگر داستان جذب روده ای آهن است .



شکل ۱: ساختار هپسیدین

انتروسیت های روده ای آهن رژیم غذایی را که عمدتا به شکل فریک Fe^{3+} و یا هم است جذب می نمایند. آهن سه ظرفیتی پس از تبدیل به شکل دو ظرفیتی فرو وارد سلول می شود. جذب هم نیز توسط یک گیرنده ویژه انجام می پذیرد.

سپس آنزیم هم اکسیژناز- یک آهن موجود در ساختار هم را از ان جدا می سازد. حال آهن جذب شده می تواند با کمک مولکول فریتین در داخل انتروسیت ها ذخیره شود.

هنگامی که نیاز بدن به آهن افزایش می یابد آهن از طریق ناقل فرو پروتیین به داخل پلاسما آزاد می شود.پس از اکسیداسیون توسط فرو اکسیداز هفستین (در سلول های روده ای) و سرولوپلاسمین (در سلول های غیر روده ای) آهن همراه با ناقل ترانسفرین در خون انتقال می یابد.

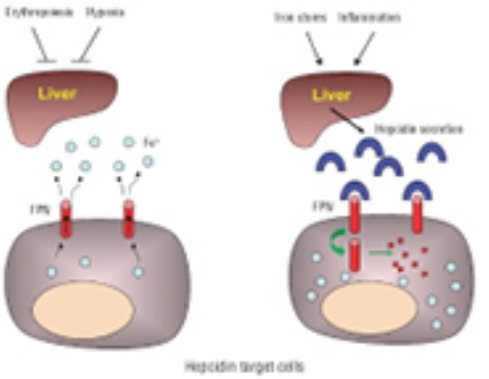
باکمک گیرنده های ترانسفرین موجود در سطح سلول های نیازمند به آهن، این فاکتور از خون برداشت شده و مورد استفاده قرار می گیرد. (۱۹،۱۰)

نقش هپسیدین در متابولیسم آهن :

گزارشات متعددی در دست است که هپسیدین به ناقل غشایی فرو پروتیین اتصال می یابد. همان طور که اشاره شد فرو پروتیین در سطح سلول های انتروسیت ، ماکروفاژها و همچنین سلول های کبدی حضور داردو نقش اصلی آن رها سازی آهن داخل سلولی به جریان خون می باشد.

متعاقب اتصال هپسیدین به فرو پروتیین مولکول های این ناقل یا به داخل سلول کشیده می شوند ویا تخریب می گردند. بتابراین دیگر قادر به ایفای نقش خود نخواهند بود. (شکل دو) نتیجه نهایی این روند کاهش برداشت آهن است. جالب توجه اینکه علاوه بر سلول های کبدی ،سلول های چربی ، ماکروفاژهاو کاردیو میوسیت ها نیز می توانند به طور موضعی به تولید هپسیدین بپردازند.

از این رو به نظر می رسد هپسیدین از طریق مکانیسم های تنظیمی مختلفی به هموستاز آهن بدن یاری می رساند.(۱۹،۱۰)



شکل ۲ - نحوه عمل هپسیدین همراه با مکانیسم های کنترل آن

تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال سیزدهم
آذر - دی
۱۳۸۹
شماره ۶۹

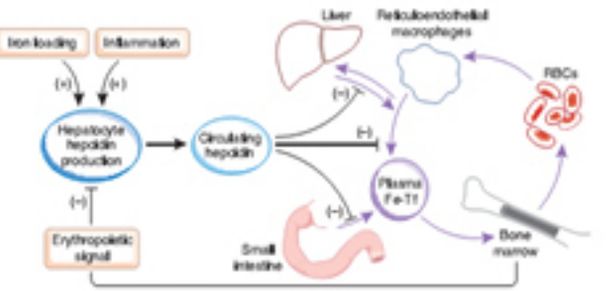
برای کنترل تولید هپسیدین حداقل چهار مکانیسم شناخته شده است. (شکل سه)

۱- تنظیم مبتنی بر ذخایر آهن : ذخایر آهن بدن اثر مثبتی بر تولید هپسیدین دارند. از آنجایی که هپسیدین باعث کاهش میزان آهن در گردش می شود، چنین کنترلی دور از منطق نیست. زیرا در مواقعی که ذخایر آهن برای نیاز بدن کافی باشد این مکانیسم از ورود آهن موجود در اریتروسیت ها بداخل جریان خون ممانعت به عمل می آورد.

۲- تنظیم مبتنی بر التهاب : یکی از مواردی که منجر به افزایش میزان هپسیدین می شود التهاب است. در واقع هپسیدین از پروتیین های فاز حاد بشمار می آید و با مکانیسمی مشابه تولید می شود. اما یادآوری می کنیم که برای شناخت جزییات نقش هپسیدین طی روند التهابی به مطالعات بیشتری نیاز هست.

۳- تنظیم مبتنی بر فعالیت خونسازی بدن : شواهد متعددی وجود دارد دال بر این که برعکس دو مورد قبل اریتروپوئز اثر مهاری بر تولید هپسیدین دارد. از آنجایی که کاهش میزان هپسیدین منجر به افزایش سطح آهن پلاسمایی میشود و آهن از فاکتور های مورد نیاز اصلی طی روند خون سازی است ، چنین تنظیمی چندان دور از انتظار نیست.

۴- هیپوکسی : گزارشاتی در دست است که نشان می دهد هیپوکسی نیز بر تولید هپسیدین اثر مهاری دارد.(۱۹،۱۷،۱۰،۴)



شکل ۳ : مکانیسم های تنظیمی تولید هپسیدین

کنتیک تولید هپسیدین

هپسیدین فاکتوری ست که در کبد تولید می شود، در خون ایفای نقش می کند و سرانجام از طریق ادرار از بدن دفع می شود.
از آنجایی که تولید هپسیدین تحت تاثیر ایتر لوکین شش و لیپو پلی ساکارید افزایش می یابدو این افزایش دقیقا از الگوی پروتیین های فاز حاد پیروی می نماید ، این فاکتور نیز یک پروتیین فاز حاد محسوب می شود.(۱۰)

اندازه گیری هپسیدین

با درنظر گرفتن این که کمتر از یک دهه از کشف هپسیدین می گذرد ، هنوز تحقیقات در مورد ارزش تشخیصی آن در بیماری های مختلف کافی نیست.
همچنین ابداع روش های استاندارد برای اندازه گیری آن در جریان است ، از این رو در حال حاضر روش پذیرفته ای که هزینه قابل قبولی هم داشته باشد در دسترس نیست هر چند که آزمایشگاه های تحقیقاتی از چندین روش برای این اندازه گیری استفاده کرده اند.

اندازه گیری هپسیدین با تکنیک دات بلات:
اولین روش نیمه کمی اندازه گیری هپسیدین ادراری بر مبنای این تکنیک انجام گرفت هر چند روش های جدید به سرعت جایگزین آن گشتند. (۱۴) یکی از اشکالات اصلی این روش عدم تفکیک مابین ایزوفرم فعال و ایزوفرم های غیر فعال می باشد.(۱۲)

اندازه گیری با تکنیک اسپکترومتری :
در سال ۲۰۰۵ kemna و همکاران توانستند با تکنیکی به نام SELDI-TOF MS(surface-enhanced laser desorp- tion/ionization time-of-flight mass spectrometry) هپسیدین ادراری را اندازه گیری نمایند. (۹) و دو سال بعد همین تکنیک با موفقیت کامل برای اندازه گیری هپسیدین سرمی نیز مورد استفاده قرار گرفت .(۸)
گزارش دیگر در این مورد مربوط به تیم MURPHY و همکاران می باشد که در سال ۲۰۰۷ تکنیکی به نام LCMS-MS chromatography tandem liquid (mass spectrometry) رابرای اندازه گیری هپسیدین به کار بردند. (۱۳)
اگرچه اسپکترومتری تکنیک مورد استفاده در بسیاری از مطالعات تحقیقاتی بوده است ، ولی بدلیل نیاز به وسایل و تجهیزات ویژه وهزینه بالا این روش نمی تواند کاربرد روتین داشته باشد.(۱۲)

روش الایزا برای اندازه گیری هپسیدین :
اولین روش الیزا برای اندازه گیری هپسیدین در سال ۲۰۰۸ به بهره برداری رسید.(۶)
به تازگی ها نیز مطالعات چندی برای مقایسه دو تکنیک الایزا و اسپکترومتری انجام گرفته است.با استناد به نتایج به دست آمده از این بررسی ها به نظر می رسد ،روش الایزا هنگام سر و کار داشتن باحجم بالایی از نمونه و همچنین کاربرد روتین متاسب ترین تکنیک است .(۱۲،۱۱،۵)

تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال سیزدهم
آذر - دی
۱۳۸۹
شماره ۶۹

ارزش تشخیصی اندازه گیری هپسیدین

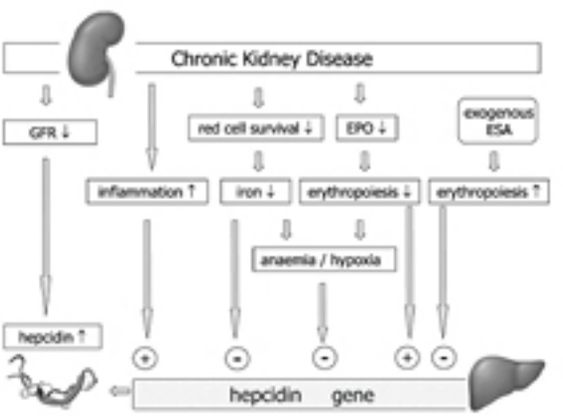
امروزه ارتباط هپسیدین با موارد کلینیکی متعددی مورد تایید قرار گرفته است.

بیماری های مزمن کلیوی ،آنمی ناشی از التهاب و آنمی ناشی از سرطان مواردی هستند که با افزایش تولید هپسیدین همراه اند . در حالی که دراغلب بیماران مبتلا به هموکروماتوزمیزان هپسیدین یا غیر قابل اندازه گیری است و یا بسیار ناچیز است.

بیماری های مزمن کلیوی -chronickidneydisease : CKD

این عبارت به گروه وسیعی از بیماری ها اطلاق میشود که عملکرد کلیه را دچار اختلال می سازند.

در بیش از ۲/۳ بیماران علت اصلی دیابت و فشار خون بالا است که به عارضه کلیوی می انجامد. از آنجاییکه در این بیماران تولید اریترو پویتین نیز مختل می شود، آنمی یکی از شایع ترین عوارض کلینیکی است.



شکل ۱ : مکانیسم های کنترل تولید هپسیدین در بیماری های مزمن کلیوی

بدیهی است که در چنین شرایطی تنظیم متابولیسم آهن به مراتب پیچیده تر است و تولید هپسیدین نیز به وضعیت آهن بدن ،التهاب ، هیپوکسی و سطح اریتروپویتین (چه درونزاد و چه برونزاد)ارتباط دارد .(شکل چهار)

طبق این نمودار التهاب چنانکه قابل پیش بینی است اثر تحریکی بر تولید هپسیدین دارد. طول عمر کاهش یافته گلبول های قرمز و در نتیجه میزان پایین آهن اثر مهاری دارد و فعالیت خون سازی بدن بسته به میزان اریتروپویتین می تواند اثر تحریکی یا مهاری داشته باشد. (۱۹،۱۸،۱۷، ۱۲،۱۰)

اندازه گیری هپسیدین ادراری در گروه زیادی از این بیماران که دارای مشکل اختلال در دفع ادرار هستندعملا غیر ممکن است .از این رو تنها راه اندازه گیری هپسیدین سرمی است.

کم خونی افراد مبتلابه بیماری های مزمن کلیوی بیشتر با تجویز " فاکتورهای تحریک کننده خونسازی " (erythropoiesis-stimulating agents-ESA)از جمله اریتروپویتین، مورد درمان قرار می گیرد.

متاسفانه حدود ۱۰٪ از بیماران به این درمان جواب نمی دهند و حتی گزارشاتی در مورد ارتباط مابین تجویز دوز بالای اریتروپویتین و مرگ ومیر نیز در دست می باشد.

بنابراین جهت اجتناب از چنین عوارضی شناسایی بیماران مقاوم به اریتروپویتین فوق العاده حائز اهمیت است . امروزه روشن شده است که نقص آهن در این مقاومت نقش اساسی دارد.

دو تست اصلی برای تشخیص کمبود آهن اندازه گیری سطح فری تین و تعیین میزان اشباع ترانسفرین (transferring saturation-TSAT) می باشد.

اگر این دو تست کاهش نشان دهندمی توان دریافت که علت اصلی آنمی کمبود آهن است، و می توان بیماران را با تجویز مکمل آهن درمان کرد. متاسفانه در گروه عمده ای از بیماران مقاوم به اریتروپویتین نه تنها نتایج تست های فوق کاهش نشان نمی دهند، بلکه تا حدودی افزایش دارندواین افراد آن هایی هستند که با عنوان مبتلایان به "نقص کارکردی آهن " خوانده می شوند.

آنمی موجود در این افراد ربطی به سطح اریتروپویتین و کمبود ذخایر آهن ندارد. بلکه مشکل اصلی میزان بالای هپسیدین است که باعث می شود سلول های رتیکولو آندوتلیال نتوانند آهن مورد نیاز برای خونسازی را در اختیار قرار دهند. بی گمان این بیماران به تجویز آهن خوراکی جواب نخواهند داد در عوض تزریق داخل وریدی آهن می تواند برای آن ها مفید باشد.

بنابر این اندازه گیری هپسیدین نه تنها برای شناسایی این افراد بلکه برای کنترل درمانشان نیز فوق العاده با ارزش است. اگر مطالعات آتی نتایج بدست آمده را تایید کنند هپسیدین می تواند به عنوان یک هدف درمانی نیز مورد بحث قرار گیرددر آن صورت از آنجایی که کاهش سطح هپسیدین می تواند به بهبود برداشت آهن از روده و ماکروفاژ ها بیانجامد ، درمان آنتی هپسیدینی می تواند جایگزین تزریق وریدی آهن شود.(۱۹،۱۸،۱۷، ۱۲،۱۰)

از دیگر عارضه های کلیوی که طی آنها افزایش میزان هپسیدین گزارش گردیده کارسینومای کلیوی(۷) و بیماران دیالیزی مبتلا به نارسایی کلیوی(۱۸) می باشند.

آنمی ناشی از التهاب (anemia of inflammation) و آنمی ناشی از کانسر (anemia of cancer):

این دو نوع آنمی نیز با میزان بالای هپسیدین مشخص می گردند . آنمی ناشی از التهاب بیشتر در بیماران مبتلا به عفونت های مزمن ،بدخیمی ، تروما و دیگر عارضه های التهابی مشاهده می شود.

تا همین اواخر ما اطلاعات زیادی در مورد اتیولوژی این نوع کم خونی نداشتیم ، ولی امروزه روشن شده است که علت اصلی آن اینترلوکین شش تولید شده طی جریان التهاب است. در واقع این سیتوکین باعث افزایش میزان هپسیدین می شود و سطح بالای هپسیدین نیز در نهایت منجر به آنمی میشود. آنمی ناشی از کانسر نیز همانطور که اشاره شد شکلی از انمی ناشی از التهاب است.(۱۶ ،۲،۱)

هموکروماتوز:

همو کروماتوز بیماری ایست که طی آن آهن بیش از حد جذب بدن شده و در بافت های مختلف رسوب می نماید. آهن اضافه باعث تخریب بافت ها مخصوصا بافت کبد، کلیه و پانکراس می شود.

مطالعات نشان داده اند که حداقل درسه فرم یک، دو وسه همو کروماتوز ارثی میزان هپسیدین بسیار پایین یا غیر قابل اندازه گیری ست.(۱۹،۱۷،۱۰،۴)

هپسیدین وجنسیت:

می دانیم که فعالیت خون سازی مرد ها بیشتر از زنان است .علت این امر هورمون تستوسترون می باشد، هر چند هنوز مکانیسم های این عملکرد هورمونی تا حدودی ناشناخته است.

به تازگی هاBachman و تیم مربوطه این پیش فرض را که تستو سترون از راه سرکوب تولید هپسیدین باعث افزایش خونسازی می شود در بوته آزمایش نهادند .

نتیجه بدست آمده پیش فرض فوق را تایید کرد. در واقع مرد هاییکه تحت تجویز تستوسترون قرار گرفته بودند میزان هپسیدین تولید شده در بدن شان به مراتب کمتر بود.(۳)

References :

1-Adamson J.W.The Anemia of Inflammation/Malignancy: Mechanisms and Management.Hematology.2008.1:159-165
2-Andrews N.C.Anemia of inflammationthe cytokine-hepcidin link. J Clin invest.2004 ;113(9):1251-1253
3-Bachman E, Feng R, Travison T, Michelle Li , Olbina G et al.Testosterone Suppresses Hepcidin in Men: A Potential Mechanism for Testosterone-Induced...J Clin Endocrinol Metab .2010; 95: 4743-4747
4-Bergamaschi G and Villani L. Serum hepcidin: a novel diagnostic tool in disorders of iron metabolism. Haematologica; 2009 December. 94(12): 1631-1633
5-Butterfield A .M, Luan P, Witcher D.R, Manetta J, Murphy A.T, Wroblewski V and Konrad R.J. A Dual-Monoclonal Sandwich ELISA Specific for Hepcidin-25.clinical chemistry ;2010. 56: 1725-1732
6-Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E and Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. Blood ; 2008 November. 112 (10) :4292-4297
7-Kamai T , Tomosugi N , Abe H , Arai K and Yoshida K.I . Increased serum hepcidin-25 level and increased tumor expression of hepcidin mRNA are associated with metastasis of renal cell carcinoma. BMC Cancer; 2009. 9: 270-279
8-Kemna E, Tjalsma H, Podust V.N, and Swinkels D.W. Mass Spectrometry-Based Hepcidin Measurement In Serum and Urine:Analytical Aspects and Clinical Implications. Clinical Chemistry; 2007. 53(4):620-628
9-Kemna E, Tjalsma H, Laarakkers C, Nemeth E, Willems H, Swinkels D . Novel urine hepcidin assay by mass- spectrometry. Blood; 2005.106:3268-70
10-Kemna E , Tjalsma H, Willems H.L,and Swinkels D.O. Hepcidin: from discovery to differential diagnosis.Haematologica;2008 Jan. 93. (1) 90-97
11-Kroot O.J, Laarakkers C.M, Geurts-Moespot A.J and co-workers . Immunochemical and Mass-Spectrometry-Based Serum Hepcidin Assays for Iron Metabolism Disorders.clinical chemistry;2010. 56: 1570-1579
Macdougall I C, Jolanta Malyszko J, Robert C. Hider R C,Bansal S.S.Current Status of the Measurement of Blood Hepcidin Levels in Chronic 12-Kidney Disease.CJASN; 2010 .5(9): 1681-1689
13-Murphy A.T, Witcher D.R, Luan P Wroblewski V.J. Quantitation of hepcidin from human and mouse serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Blood; 2007.110:1048-1054
14-Nemeth E,Valore E.V,Territo M et al. Hepcidin, a putative mediator of inflammation of anemia is a type II acute phase protein .blood; 2003.101:2461-2463
15-Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P et al. Hepcidin,the hormone of iron metabolism,is bound specificallyto-2- macroglobulin in blood.Blood :2009.113:6225-6236
16-Sharma S, Nemeth E, Chen Y.H, Goodnough J, Huston A.Roodman G.D, s Ganz T, and Lichtenstein A . Involvement of Hepcidin in the Anemia of Multiple Myeloma. ClinCancerRes;2008.14(11): 3262-3267
17-Swinkels D.W and Wetzels J. F.Hepcidin:a new tool in the management of anaemia in patients with chronic kidney diseases.Nephrol Dial Transplant; 2008.23:2450-2453
18-Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya H, Umehara H and Ishikawa I. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using
Protein Chip System. Blood; 2006.108:1381-1387
19-Young B and Zaritsky J. Hepcidin for Clinicians. Clin J Am Soc Nephrol; 2009. 4:1384-1387