

## بررسی ارتباط میکروآلبومینوری و ژن VacA هلیکوباکتر پیلوری در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو از طریق PCR نمونه‌ی مدفوع

لطیفه عبداللہی<sup>۱</sup>، دکتر محمدرضا ذوالفقاری<sup>۲</sup>، دکتر مسعود امینی<sup>۳</sup>، دکتر رسول صالحی<sup>۴</sup>

### چکیده

**مقدمه:** بیماری دیابت به علت شیوع قابل توجه و عوارض دیررس حایز اهمیت می‌باشد. یکی از عوارض دیررس دیابت، نفروپاتی دیابتی می‌باشد که با عوارض و مرگ و میر قابل توجهی همراه است. میکروآلبومینوری یکی از عوامل پیش‌گویی کننده‌ی نفروپاتی دیابتی می‌باشد. شیوع نفروپاتی دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو ۴۷ درصد است. بنابراین میکروآلبومینوری باید در مراحل اولیه تشخیص داده شود تا با به کارگیری داروهای مهار کننده از پیشرفت نفروپاتی دیابتی جلوگیری به عمل آید. هلیکوباکتر پیلوری (*H. pylori*) یکی از عواملی است که می‌تواند در بیماران مبتلا به دیابت به دلیل سطح ایمنی پایین‌تر ایجاد عفونت کند. همچنین گزارش‌هایی مبنی بر مؤثر بودن ژنوتیپ‌های به خصوصی از *H. pylori* در ایجاد میکروآلبومینوری ارایه شده است. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی ارتباط میکروآلبومینوری و ژن VacA هلیکوباکتر پیلوری در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو از طریق PCR (Polymerase chain reaction) نمونه‌ی مدفوع بود.

**روش‌ها:** در این مطالعه ۸۸ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو مراجعه کننده به مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان مورد بررسی قرار گرفتند. ۶۰ نفر از آن‌ها مبتلا به میکروآلبومینوری و ۲۸ نفر بدون میکروآلبومینوری بودند. پس از جمع‌آوری نمونه‌ی مدفوع بیماران، استخراج DNA توسط کیت کیاژن انجام شد. سپس از طریق Nested PCR جداسازی *H. pylori* انجام شد و در نهایت PCR با پرایمرهای VacA برای ژنوتایپینگ *H. pylori* از لحاظ دارا بودن ژن VacA انجام گردید.

**یافته‌ها:** با روش استفاده شده در این مطالعه در کل شانزده نفر (۱۸/۲ درصد) آلوده به *H. pylori* تشخیص داده شدند که ۱۲ نفر (۷۵ درصد) آن‌ها مبتلا به میکروآلبومینوری و ۴ نفر از آن‌ها (۲۵ درصد) بدون میکروآلبومینوری بودند. با ژنوتایپینگ نمونه‌های *H. pylori* مثبت، یک نمونه دارای ژن VacA بود.

**نتیجه‌گیری:** در جمعیت مورد مطالعه‌ی ما، ارتباطی بین ژن VacA در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو و ابتلا به میکروآلبومینوری وجود نداشت.

**واژگان کلیدی:** هلیکوباکتر پیلوری، VacA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، دیابت نوع دو، میکروآلبومینوری

### مقدمه

بهداشتی - درمانی و اجتماعی - اقتصادی جهان محسوب می‌شود. بر اساس پیش‌بینی سازمان جهانی بهداشت انتظار می‌رود که جمعیت بیماران مبتلا به دیابت از ۱۷۱ میلیون نفر در سال ۲۰۰۰ به ۳۶۶ میلیون نفر در سال ۲۰۳۰ افزایش یابد (۲). بررسی‌ها حاکی از آن است که در سال ۲۰۲۵ میلادی بیش از ۷۵ درصد

دیابت بیماری مزمن متابولیکی است که با افزایش در میزان قند خون و اختلالاتی در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین مشخص می‌شود (۱). اهمیت این بیماری به دلیل شیوع و عوارض آن است. امروزه دیابت یکی از مهم‌ترین مشکلات

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

<sup>۲</sup> استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

<sup>۳</sup> استاد، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

<sup>۴</sup> دانشیار، بخش ژنتیک، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤؤل: دکتر رسول صالحی  
Email: r\_salehi@med.ac.ir

ژنی به نام VacA (Vacuolating cytotoxin A) است که باعث ایجاد واکوئل در سلول‌های پستانداران می‌شود و در نهایت به مرگ سلول منجر می‌گردد (۱۱-۱۲). VacA از دو زیر واحد S (Signal) و M (Middle) تشکیل شده است. زیر واحد S از دو قسمت S1 و S2 و زیر واحد M هم از دو قسمت M1 و M2 تشکیل شده است که نوع S1/M1 بیشترین خاصیت التهاب‌زایی را دارد (۱۳).

با توجه به این که بیماران مبتلا به دیابت درصد زیادی از جامعه را تشکیل می‌دهند و همچنین این افراد در معرض ابتلا به میکروآلبومینوری و عفونت با H.pylori هستند و با توجه به اهمیت تشخیص زودهنگام میکروآلبومینوری در پیش‌گیری از نروپاتی دیابتی، بر آن شدیم تا ارتباط ژن ویروانس هلیکو باکتر پیلوری VacA با میکروآلبومینوری را در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ بررسی کنیم.

### روش‌ها

در این مطالعه ۸۸ نمونه‌ی مدفوع افراد مبتلا به دیابت نوع دو که به مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شد. بیماران مبتلا به دیابت نوع دو مبتلا به میکروآلبومینوری و بدون میکروآلبومینوری از نظر سن، جنس، بیماری قلبی، فشار خون بالا، مصرف دخانیات، شاخص توده‌ی بدنی (Body mass index یا BMI)، تری‌گلیسرید (Triglyceride یا TG)، لیپوپروتئین با دانسیته‌ی پایین (Low density lipoprotein یا LDL)، لیپوپروتئین با دانسیته‌ی بالا (High density lipoprotein یا HDL) و هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1C) و همچنین عدم مصرف آنتی‌بیوتیک و یا هر گونه درمانی برای

کل جمعیت افراد مبتلا به دیابت در کشورهای در حال توسعه خواهند بود (۳). در کشور ما حدود ۴ میلیون نفر مبتلا به دیابت هستند و سالانه به طور متوسط ۵۰۰ هزار نفر به بیماران مبتلا به دیابت کشور اضافه می‌شود (۴). طبق مطالعات انجام شده در سال ۱۳۸۰ جمعیت بیماران مبتلا به دیابت در ایران در جمعیت بالای ۲۰ سال ۱/۶ میلیون نفر برآورد شده است. بر مبنای پیش‌بینی کارشناسان سازمان جهانی بهداشت میزان شیوع دیابت نوع دو در ایران در سال ۲۰۲۵ بالغ بر ۵۱۲۵۰۰۰ نفر خواهد بود (۵). امروز میکروآلبومینوری در افراد دیابتی تیپ دو حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد است (۶).

در طی دو دهه‌ی اخیر افزایش بروز مرحله انتهایی نارسایی کلیه (End stage renal disease یا ESRD) در بین بیماران مبتلا به دیابت به خصوص نوع دوم مشاهده شده است. بر اساس مطالعات قبلی شیوع نروپاتی تا ۴۷ درصد در بین مبتلایان به دیابت نوع دوم گزارش شده است (۷). مطالعات محدودی ژنوتیپ‌های خاصی از هلیکوباکتر پیلوری (H.pylori) را در ایجاد میکروآلبومینوری مؤثر دانسته‌اند. با توجه به این نکته که بیماران مبتلا به دیابت به دلیل سطح ایمنی پایین‌تر بیشتر در معرض عفونت H.pylori قرار می‌گیرند، ممکن است H.pylori نقشی در شیوع میکروآلبومینوری در این بیماران داشته باشد (۸-۹). احتمال داده‌اند که آنتی‌ژن‌های سویه‌های بیماری‌زای H.pylori در برخورد با سلول‌های اندوتلیال باعث بروز پاسخ ایمنی و در نتیجه ایجاد فرایندهای پاتولوژیک شوند که همین امر باعث دفع آلبومین می‌گردد (۱۰). یکی از فاکتورهای ویروانس مهم که در حدود ۵۰ درصد از H.pylori‌ها وجود دارد، کاست

تهاجمی بودن روش و قابل قبول بودن آن برای بیماران بود؛ هر چند که حساسیت آن کمتر از روش‌هایی نظیر بیوبسی معده و کشت می‌باشد. اما با توجه به این که مطالعه به صورت مورد-شاهدی (Case-control) طراحی شد، شرایط برای هر دو گروه از نظر حساسیت روش یکسان بود.

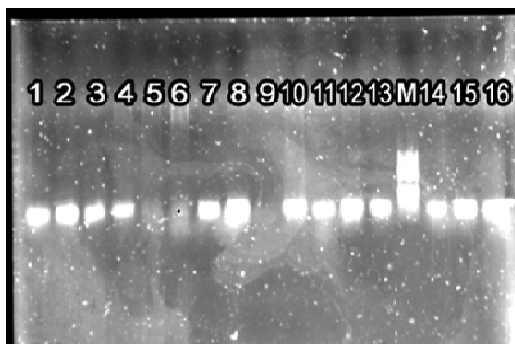
استخراج DNA از نمونه‌های مدفوع با استفاده از کیت استخراج DNA کواژن (QIAamp stool mini kit) انجام گردید. DNAهای استخراج شده، پس از انجام آنالیزهای کمی و کیفی، در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. کلیه‌ی DNAهای استخراج

H.pylori بررسی شدند. ۶۰ نفر از بیماران مورد مطالعه مبتلا به میکروآلبومینوری و ۲۸ نفر بدون میکروآلبومینوری بودند. ملاک ابتلا به میکروآلبومینوری عبارت از نسبت آلبومین به کراتینین ادرار بین ۳۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر. پس از فراخوان بیماران مبتلا به دیابت تیپ دو مبتلا به میکروآلبومینوری و بدون میکروآلبومینوری بر اساس محتویات پرونده بیماران نمونه‌ی مدفوع آن‌ها جمع‌آوری و تا زمان استفاده برای استخراج DNA در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. علت استفاده از نمونه‌ی مدفوع به واسطه‌ی غیر

جدول ۱. برنامه‌ی 16srRNA و Nested PCR، VacA PCR

توالی پرایمر (Primer sequences)	اندازه‌ی محصول (bp)	شرایط PCR	ژن هدف
5'-CCTACGGGAGGCAGCAGTAG-3' 5'-CAACAGAGCTTACGATCCGAAA-3'	۵۰۰	۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ دقیقه (۱ دور)، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه (۳۵ دور)، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه (۱ دور) دور اول:	16srRNA
5'-AAGCCTTTAGGGGTGTAGGGGTTT-3' 5'-AAGCCTACTTTCTAACACTAACGC-3'	۲۵۰	۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ دقیقه (۱ دور)، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ دقیقه (۱ دور) دور دوم:	H. pylori UreC gene
5'-CTTCTCTCAAGCAATTGTC-3' 5'-CAAGCCATCGCCGTTTTAGC-3'	S1 = ۲۵۹ S2 = ۲۸۶	۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ دقیقه (۱ دور)، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه (۴۵ دور)، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ دقیقه (۱ دور)	VacA (s)
5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3' 5'-CTGCTGAATGCGCCAAAC-3'	M1 = ۵۷۰ M2 = ۶۴۲	۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۴ دقیقه (۱ دور)، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۵۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه (۳۵ دور)، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱۰ دقیقه (۱ دور)	VacA (m)

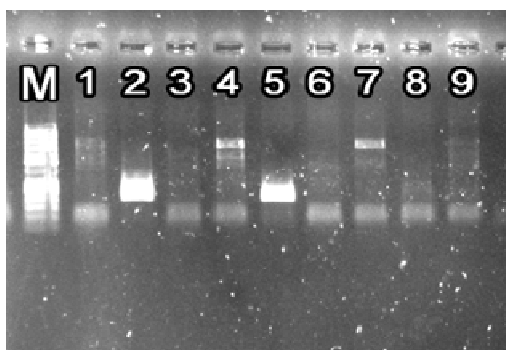
همچنین میزان VacA+ در جمعیت مورد مطالعه، ۶/۲۵ درصد به دست آمد (شکل ۳).



شکل ۱. محصول PCR با استفاده از پرایمرهای مخصوص

ژن 16srRNA بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

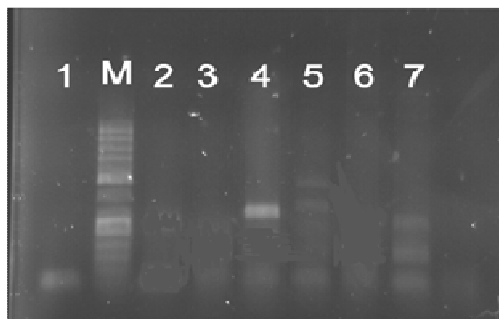
ردیف‌های شماره‌ی ۵، ۶ و ۹ نمونه‌هایی را نشان می‌دهند که DNA استخراج شده از نمونه‌ی مدفوع بیماران قابل تکثیر با روش PCR نبوده است. M = مارکر وزن مولکولی ۵۰ bp



شکل ۲. محصول PCR با استفاده از پرایمرهای Ure C بر

روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

ردیف‌های شماره‌ی ۲ و ۵ نمونه‌هایی را نشان می‌دهند که آلوده به هلیکوباکتر پیلوری بودند.



شکل ۳. محصول PCR با استفاده از پرایمرهای VacA بر روی

ژل آگارز ۱/۵ درصد

ردیف شماره‌ی ۴ نمونه‌ای را که دارای ژن VacA است، نشان می‌دهد.

شده از نمونه‌ی مدفوع بیماران برای اطمینان از عدم وجود ممانعت کننده‌ی Polymerase chain reaction (PCR) با استفاده از پرایمرهای مخصوص 16SrRNA تکثیر شد. برای انجام واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر 10x buffer، ۲۰۰ میلی‌مول dNTPs، ۱/۵ میلی‌مول MgCl<sub>2</sub>، ۲/۵ واحد Taq DNA polymerase، ۱۰۰ نانوگرم DNA و ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرهای F و R انجام شد (جدول ۱).

سپس Nested PCR جهت جداسازی H.pylori

انجام شد (در حجم ۲۵ میکرولیتر، ۵ میکرولیتر ۱۰ x buffer، ۲۰۰ میلی‌مول dNTPs، ۱/۵ میلی‌مول MgCl<sub>2</sub>، ۲/۵ واحد Taq polymerase، ۱۰۰ نانوگرم DNA و ۱۰ پیکومول از پرایمر خارجی (برای دور اول) و پرایمر داخلی به همراه ۳ میکرولیتر از محصول PCR مرحله‌ی اول برای دور دوم) (جدول ۱). برای بررسی وجود ژن vacA طبق مطالعه‌ی Bener و همکاران (۸) عمل گردید. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد.

#### یافته‌ها

با استفاده از کیت استخراج DNA از مدفوع (QiaAmp) میزان DNA به دست آمده که با PCR و پرایمرهای مخصوص 16srRNA قابل تکثیر بود، ۹۲ درصد محاسبه شد (شکل ۱).

برای نمونه‌هایی که قابلیت تکثیر نداشتند، فرایند کار تکرار شد و یا نمونه‌ی دیگری جایگزین آن‌ها گردید. میزان شیوع H.pylori که با PCR و پرایمرهای Ure C بر روی نمونه‌ی مدفوع بیماران بررسی شد، ۱۸/۸ درصد به دست آمد (شکل ۲).

در این مطالعه ۸۸ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو بررسی شدند، ۶۰ نفر (۶۸/۲ درصد) از آن‌ها مبتلا به میکروآلبومینوری و ۲۸ نفر (۳۱/۸ درصد) بدون میکروآلبومینوری بودند. از ۱۶ نفر بیمار مبتلا به H.pylori، ۱۲ نفر (۷۵ درصد) و از ۷۲ نفر افراد غیر مبتلا به H.pylori، ۴۸ نفر (۶۶/۷ درصد) مبتلا به میکروآلبومینوری بودند که آزمون  $\chi^2$  این اختلاف را معنی‌دار نشان نداد ( $P = ۰/۵۲$ ). به عبارت دیگر، بین H.pylori و ابتلا به میکروآلبومینوری رابطه‌ی معنی‌داری وجود نداشت.

از بین ۱۶ نمونه‌ی H.pylori مثبت، یک نمونه (۶/۲۵ درصد) دارای ژن VacA(S) بود که از گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع دو بدون میکروآلبومینوری بود. بین میکروآلبومینوری و VacA نیز رابطه‌ی معنی‌داری به دست نیامد (جدول ۲).

جدول ۲. رابطه‌ی بین میکروآلبومینوری و VacA در بیماران

#### H.pylori مثبت

VacA	بدون میکروآلبومینوری	
	تعداد	(درصد)
مثبت	۱	(۲۵)
منفی	۳	(۷۵)
جمع	۴	(۱۰۰)

طبق آزمون Student-t میانگین HDL، LDL و TG در افراد مبتلا به میکروآلبومینوری و بدون میکروآلبومینوری از نظر آماری تفاوت نداشت (جدول ۳).

از نظر آماری در جمعیت مورد مطالعه‌ی ما زنان بیشتر از مردان مبتلا به میکروآلبومینوری بودند ( $P < ۰/۰۳$ ) (جدول ۴).

همچنین زنان بیشتر از مردان در معرض عفونت با

جدول ۳. مقایسه‌ی میانگین متغیرهای کمی مختلف بر حسب وجود

#### میکروآلبومینوری

مقدار P	بدون میکروآلبومینوری	با میکروآلبومینوری	
< ۰/۰۲	۵۴ ± ۹/۸	۴۸/۸ ± ۷/۵	سن
۰/۹۹	۴۱/۹ ± ۹/۰۲	۴۱/۸ ± ۱۱/۶	HDL
۰/۱۲	۹۵/۴ ± ۳۲/۶	۱۰۵/۲ ± ۳۵/۲	LDL
۰/۱۱	۱۳۶/۸ ± ۵۲/۹	۱۵۹/۸ ± ۸۸/۷	TG
۰/۹۸	۱۱/۸۱ ± ۱/۵	۱۱/۸ ± ۱/۳۶	systol
۰/۵۳	۷/۴ ± ۰/۸۶	۷/۲ ± ۰/۹۵	diastol

جدول ۴. توزیع فراوانی میکروآلبومینوری به تفکیک جنس

میکروآلبومینوری	توزیع فراوانی	
	مردان	زنان
مثبت	۱۴ (۴۱/۲)	۱۴ (۲۵/۹)
منفی	۲۰ (۵۸/۸)	۴۰ (۷۴/۱)
جمع	۳۴ (۱۰۰)	۵۴ (۱۰۰)

جدول ۵. توزیع فراوانی H.pylori بر حسب جنس

H.pylori	توزیع فراوانی	
	مردان	زنان
مثبت	۴ (۱۱/۸)	۱۲ (۲۲/۲)
منفی	۳۰ (۸۸/۲)	۴۲ (۷۷/۸)
جمع	۳۴ (۱۰۰)	۵۴ (۱۰۰)

#### بحث

میکروآلبومینوری ساده‌ترین و حساس‌ترین فاکتور برای نشان دادن و ارزیابی خطر و مشخص کردن بیماری کلیوی در بیماران مبتلا به دیابت است. درمان اصلی نفروپاتی دیابتی، پیش‌گیری است و

جدول ۶. توزیع فراوانی میکروآلبومینوری بر حسب دامنه‌ی سنی

سال	بیشتر از ۶۰	۵۱-۶۰ سال	۴۱-۵۰ سال	۳۰-۴۰ سال	میکروآلبومینوری
(درصد) تعداد	(درصد) تعداد	(درصد) تعداد	(درصد) تعداد	(درصد) تعداد	
۵ (۸۳/۳)	۶ (۲۰)	۷ (۲۸)	۱ (۱۲/۵)		منفی
۱ (۱۶/۷)	۲۴ (۸۰)	۱۸ (۷۲)	۷ (۸۷/۵)		مثبت
۶ (۱۰۰)I	۳۰ (۱۰۰)	۲۵ (۱۰۰)	۸ (۱۰۰)		جمع

میکروآلبومینوری می‌بایستی در مراحل اولیه تشخیص داده شود. بنابراین بررسی عوامل مرتبط با آن برای پایه‌گذاری راه‌های مؤثر و برجسته در جهت پیش‌گیری ضروری است. نفروپاتی طیف وسیعی از آسیب‌های کلیه شامل افزایش فیلتراسیون، میکروآلبومینوری، پروتئینوری و نارسایی مزمن و انتهایی کلیه را در بر می‌گیرد. نفروپاتی در ۳۰ تا ۴۰ درصد بیماران مبتلا به دیابت دیده می‌شود و شایع‌ترین علت نارسایی مزمن کلیه است (۱۴). میکروآلبومینوری اولین علامت تشخیصی ابتلای کلیه است و کنترل آن از عوامل پیش‌گیری کننده از پیشرفته‌تر شدن نفروپاتی در بیماران مبتلا به دیابت می‌باشد (۱۴). میزان شیوع میکروآلبومینوری در افراد مبتلا به دیابت نوع دو در اصفهان ۱۶/۶ درصد (۱۴)، در اهواز ۳۵/۲ درصد و در تهران ۲۰/۳ درصد گزارش شده است (۱۵). با توجه به استعداد بیماران مبتلا به دیابت برای ابتلا به عفونت‌های مختلف که می‌تواند ناشی از عواملی مانند اختلالات ایمنی متعدد، اختلالات حرکتی معده و افزایش تعداد ویزیت‌های بیمارستانی باشد و همچنین وجود شکایات گوارشی مختلف در این بیماران، این امر محتمل به نظر می‌رسد که علت برخی عفونت‌های گوارشی ذکر شده، عفونت با *H.pylori* باشد (۱۵).

میکروآلبومینوری بررسی شد. با توجه به یافته‌ها با تعداد نمونه‌ی کار شده بین ژن VacA و میکروآلبومینوری در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو رابطه‌ی معنی‌داری وجود نداشت، ولی بین شیوع میکروآلبومینوری و گروه‌های سنی ارتباط معنی‌داری وجود داشت و فراوانی میکروآلبومینوری از ۶۰ سال به بالا کاهش محسوسی داشت. در مطالعه‌ای که افخمی اردکانی و همکاران در یزد انجام دادند، ارتباط معنی‌داری بین شیوع میکروآلبومینوری و سن بیماران دیده نشد (۱۶).

شیوع عفونت *H.pylori* در ژاپن ۹۰ درصد (۱۷) و شیوع آن در ایران بین ۸۲-۹۲ درصد گزارش شده است (۱۱). بر اساس مطالعه‌ای که در کردستان انجام شد، شیوع عفونت با *H.pylori* در این جمعیت حدود ۳۶/۵ درصد برآورد گردید که به نظر می‌رسد نسبت به سایر مناطق جهان و ایران کمتر باشد (۱۸). میزان شیوع در شهر اردبیل ۴۷/۵ درصد و در شهر یزد ۳۰/۶ درصد برآورد شده است (۱۹). در شهر سمنان میزان شیوع *H.pylori*، ۴۸ درصد گزارش گردیده است (۲۰). مطالعه‌ی مختاری نشان داد که میزان عفونت *H.pylori* در کودکان ۱ تا ۷ سال در مناطق پر جمعیت شهر اصفهان حدود ۶۴ درصد و در مناطق کم جمعیت این شهر حدود ۳۱ درصد بوده است. اختلاف شیوع در مناطق مختلف یک شهر بیانگر اهمیت تفاوت‌های منطقه‌ای است (۲۱).

در این مطالعه ارتباط ژن ویرولانس VacA در *H.pylori* در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو با

با توجه به این که جمعیت مورد مطالعه‌ی ما به صورت تصادفی انتخاب نشده بودند بلکه به صورت اختصاصی بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و مراجعه کننده به مرکز غدد و متابولیسم اصفهان بودند، شیوع پایین عفونت *H.pylori* ممکن است ناشی از این مسئله باشد. میزان شیوع در مناطق شهری و روستایی شهر قزوین حدود ۷۹ درصد گزارش شده است (۱۸). در یک مطالعه‌ی پیشین، با افزایش سن، شیوع عفونت افزایش نشان داده و میزان عفونت در سنین بالاتر بیشتر بوده است (۲۰). به نظر محققین شیوع بیشتر عفونت در سنین بالا در بعضی مناطق به این دلیل است که میزان آلودگی در کودکان این مناطق پیش از این بسیار زیاد بوده است. این کودکان اکنون به سنین بزرگسالی رسیده‌اند و سرولوژی آن‌ها مثبت می‌شود (۲۰). میزان شیوع *H.pylori* در نمونه‌ی مدفوع در فرانسه و آلمان به ترتیب ۲۵/۴ و ۳۹/۲ درصد گزارش شده است (۱۲). میزان شیوع *H.pylori* در نمونه‌های مدفوع بیماران در فرانسه با شیوعی که ما با استفاده از نمونه‌ی مدفوع بیماران به دست آوردیم بسیار نزدیک است (۸). در مطالعه‌ای دیگر میزان شیوع *H.pylori* در کشورهای در حال توسعه ۸۰ درصد و در کشورهای توسعه یافته ۳۰ درصد گزارش شده است (۱۹). به نظر می‌رسد حضور هم‌زمان ژن‌های *cagA* و آل‌هایی از *VacA* که دارای فعالیت واکوئله‌کنندگی هستند، باعث افزایش بیماری‌زایی *H.pylori* می‌شود. مطالعات اپیدمیولوژیک به همراه مطالعاتی که بر روی حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته است، پتانسیل بیماری‌زایی بیشتر سویه‌های دارای ژن *cagA* و فعالیت توکسیک *VacA* را که می‌توانند سبب القای ترشح اینترلوکین ۱ در سلول‌های پوششی شوند، نشان

دادند (۱۰).

طبق مطالعه‌ای که توسط فرشاد و همکاران انجام شد، از ۶۵ سوش *H.pylori* جدا شده، ۳۱ سوش (۴۷/۶۹ درصد) دارای ژن *cagA*، ۳۷ سوش (۵۶/۹۲ درصد) دارای ژن *VacA* و ۴۲ سوش (۶۴/۶۱ درصد) دارای ژن *ure AB* بودند (۱۰). اتصال *H.pylori* به اپی‌تلیوم معده و ترشح اینترلوکین‌ها یک مرحله‌ی مهم در القای التهاب فعال لایه‌ی مخاطی می‌باشد که می‌تواند به تولید زخم منجر شود (۱۳). از سوی دیگر، در یک سری مطالعات مشخص شده است که عفونت با *H.pylori* می‌تواند سبب افزایش تولید سایتوکین‌هایی نظیر  $IL-1$ ،  $IL-6$ ،  $IL-8$ ،  $IL-17$ ،  $IL-23$ ،  $TNF\alpha$  و  $VEGF$  (Vascular endothelial growth factor) شود. این سایتوکین‌های التهابی می‌توانند باعث تغییر نفوذپذیری غشای گلوامروولی و خروج آلبومین و ایمنوگلوبین‌ها در ادرار شوند. از طرفی باعث فراخوانی پلی‌مورفونوکلئرها می‌گردند (۱۰). *VacA* باعث تولید  $TNF\alpha$ ،  $IL-1\beta$ ،  $IL-1$ ،  $\alpha IL-1$ ،  $IL-6$ ،  $IL-10$  و  $IL-13$  می‌شود (۱۲). نقش سایتوکین‌های التهاب‌زایی چون اینترلوکین ۱، ۶ و ۸ در پیلونفریت، ثابت شده است. مطالعات انجام شده نشان داده است که مهار *BCL-2* در موش باعث ناهنجاری‌هایی مثل کلیه‌ی پلی‌کیستیک گردیده است، بنابراین ارتباط بین میزان بیان ژن *BCL-2* و ایجاد بیماری‌های کلیوی مطرح می‌شود (۲۳). از طرفی، در مطالعات دیگری مشخص شده است که عفونت *H.pylori* باعث کاهش بیان ژن *BCL-2* در سلول‌های هدف می‌شود (۲۴). این کاهش بیان توسط عفونت هلیکوباکتر پیلوری *cagA+/VacA+* بیشتر از سایر موارد ایجاد شد و پس از آن، سویه‌های

VacA در ایجاد میکروآلبومینوری در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو با عفونت H.pylori را به دست آورد و یا بر نتیجه‌ای که طی مطالعه‌ی حاضر به دست آمد، صحه گذاشت.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه‌ی بیمارانی که در این تحقیق با رضایت کامل شرکت نمودند و نیز پرسنل مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان کمال تشکر و قدردانی را داریم.

cagA-/VacA+ اثر بیشتری را نشان دادند. وجود ژن VacA و کاهش بیان BCL-2 و ایجاد مشکلات کلیوی می‌تواند ارتباط معنی‌داری را در بیماران آلوده به عفونت هلیکوباکتر بیان نماید (۲۳-۲۴). از طرفی در برخی مطالعات، همراهی افزایش سایتوکین‌های مختلف با عفونت H.pylori نشان داده شده است (۲۳-۲۴). همچنین ارتباط نارسایی‌های کلیوی با بعضی از ایتروکین‌ها در مطالعات بسیاری به اثبات رسیده است (۲۳-۲۴).

بنابراین با توجه به مطالب فوق احتمال دارد در مطالعه‌ای با حجم نمونه‌ی بیشتر بتوان اثرات ژن

### References

1. Abbasian M, Delvarian-Zadeh M. Evaluation of diabetes complications among the diabetic patients visiting the Shahroud diabetic, s clinic. Knowledge and Health Journal 2008; 2(4): 16-20.
2. Azizi F. Diabetes mellitus in the Islamic Republic of Iran. IDF Bull 1996; 41: 9-38.
3. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Research and Clinical Practice 2010; 87(1): 4-14.
4. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. Diabetes Care 1998; 21(9): 1414-31.
5. Mogensen CE. Combined high blood pressure and glucose in type 2 diabetes: double jeopardy. British trial shows clear effects of treatment, especially blood pressure reduction. BMJ 1998; 317(7160): 693-4.
6. Papazafiropoulou A, Daniil I, Sotiropoulos A, Balampani E, Kokolaki A, Bousboulas S, et al. Prevalence of asymptomatic bacteriuria in type 2 diabetic subjects with and without microalbuminuria. BMC Research Notes 2010; 3: 169
7. Falsafi T, Favaedi R, Mahjoub F, Najafi M. Application of stool-PCR test for diagnosis of Helicobacter pylori infection in children. World J Gastroenterol 2009; 15(4): 484-8.
8. Bener A, Micallef R, Afifi M, Derbala M, Al-Mulla HM, Usmani MA. Association between type 2 diabetes mellitus and Helicobacter pylori infection. Turk J Gastroenterol 2007; 18(4): 225-9.
9. Ibrahim A, Zaher T, Ghonemy TA, El-Azim SA, El-Azim MA, Ramadan A. Impact of cytotoxin-associated gene A of Helicobacter pylori strains on microalbuminuria in type 2 diabetes. Saudi J Kidney Dis Transpl 2010; 21(4): 694-700.
10. Farshad SH, Japoni A, Alborzi A, Kalani M. Genotyping of helicobacter pylori strains isolated from patients with gastric ulcer and non ulcer disease using RFLP-PCR of ureAB, vacA, cagA genes. Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences 2008; 15(3): 11-7.
11. Supajatura V, Ushio H, Wada A, Yahiro K, Okumura K, Ogawa H, et al. Cutting edge: VacA, a vacuolating cytotoxin of Helicobacter pylori, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines. J Immunol 2002; 168(6): 2603-7.
12. Sasaki T, Hirai I, Izurieta R, Kwa BH, Estevez E, Saldana A, et al. Analysis of helicobacter pylori Genotype in stool specimens of asymptomatic people. LabMedicine 2009; 40(7): 412-4.
13. Amini M, Safaei H. Albuminuria and its risk factors in newly diagnosed type 2 diabetes. IJEM 2006; 8(4): 375-81.
14. Ariabod V, Tabrizian F, Jalili D, Hakimi Tabar M. The prevalence and some risk factors of microalbuminuria among type 2 diabetics that referred to a diabetes clinic. Medical Science Journal Islamic Azad University-Mashhad Branch 2009; 5(2): 79-84.
15. Sun J, Aoki K, Zheng JX, Su BZ, Ouyang XH, Misumi J. Effect of NaCl and Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin on cytokine expression



- and viability. *World J Gastroenterol* 2006; 12(14): 2174-80.
16. Afkhami Ardakani M, Modarresi M, Amirchaghmaei E. Microalbuminuria and its risk factors in patients with type 2 diabetes. *Iranian Journal of Diabetes and Lipid Disorders* 2004; 3(1): 47-52.
  17. Jafarzadeh A, Mirzaei V, Nemati M. Serum Level interleukin IL -17 and -23 in patients with peptic ulcers infected by *Helicobacter pylori*. *Journal of Microbial Biotechnology, Islamic Azad University* 2009; 1(2): 31-6.
  18. Yazdanpanah K, Rahimi E, Sharifian A, Eishi A. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Kurdistan Province, 2006. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences* 2009; 14(1): 4-5.
  19. Mikaeli J, Malekzadeh R, Ziad Alizadeh B, Nasser Mogaddam S, Valizadeh M, Khoncheh R, et al. *Helicobacter pylori* prevalence in two Iranian provinces with high and low incidence of gastric carcinoma. *Tehran university Medical Journal* 1999; 57(1): 34-8.
  20. Moradi A, Rashidy-Pour A. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Semnan. *Koomesh* 2000; 1(4): 53-7.
  21. Mokhtari M. Evaluation of antibody of *Helicobacter pylori* infection in preschool children in Isfahan. *Iranian Journal of Gastroenterology* 2002; 36: 33-8.
  22. Sheikholeslami H, GhasemiBarghi R, Moosavi H. Comparison of prevalence of *Helicobacter pylori* infection in urban and rural areas of Qazvin (2002). *The Journal of Qazvin Univesity of Medical Sciences* 2004; 8(3): 47-51.
  23. Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Kuida K, Sawa H, Loh DY. Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(9): 3700-4.
  24. Mojtahedi A, Salehi R, Navabakbar F, Tamizifar H, Andalib A, Ghasemian Safaii H, et al. Apoptosis induction on AGS gastric adenocarcinoma and HEF fibroblast cell lines by wild type and cagA or vacA Negative *Helicobacter pylori* Strains. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* 2007; 18(3203): 208.

## The Relation between Microalbuminuria and Helicobacter Pylori VacA Gene in Type 2 Diabetic Patients, Isfahan, Iran

Latifeh Abdollahi MSc<sup>1</sup>, Mohammad Reza Zolfaghari PhD<sup>2</sup>, Masoud Amini MD<sup>3</sup>,  
Rasoul Salehi PhD<sup>4</sup>

### Abstract

**Background:** Diabetes mellitus is the most prevalent metabolic disorder worldwide with many subsequent medical complications. An important complication of diabetes is microalbuminuria which is a major indication for development of diabetic nephropathy. The prevalence of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients has been estimated to be 47%. Since the disorder initiates with microalbuminuria, its early detection and prevention are vital. On the other hand, helicobacter pylori infection is more common in diabetic patients due to their low immune tolerance. The vacA positive genotype is reported to be effective in microalbuminuria development in type 2 diabetic patients. In this study, we investigated the relation between H. pylori vacA and microalbuminuria in type 2 diabetic patients.

**Methods:** This study included 88 type 2 diabetic patients among whom 60 had microalbuminuria. Stool samples were collected from all patients and DNA was extracted using QiaAmp Stool DNA Extraction Minikit. In order to detect H. pylori infection, a nested polymerase chain reaction (PCR) protocol was developed and all H. pylori positive samples were genotyped for cagA positivity.

**Findings:** Overall, 16 patients (18.2%) were detected to be H. pylori positive out of whom 12 had microalbuminuria (75%). VacA positivity was detected in one patient without microalbuminuria.

**Conclusion:** We could not establish a relationship between vacA positivity and microalbuminuria in the studied type 2 diabetic patients.

**Keywords:** Helicobacter pylori, VacA, Polymerase chain reaction, Type 2 diabetes, Microalbuminuria

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

<sup>3</sup> Professor, Endocrine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor, Department of Anatomy and Molecular Biology, School of Medicine, Pediatric Inherited Diseases Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Rasoul Salehi MD, Email: r\_salehi@med.ac.ir