مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۱۹۳/هفته سوم مردادماه ۱۳۹۱
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۶

# ارتباط میکروآلبومینوری و ژن cagA هلیکوباکتر پیلوری در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو

زهرا ملاباشی[۱]، دکتر محمدرضا ذوالفقاری[۲]، دکتر مسعود امینی[۳]، دکتر رسول صالحی[۴]

## چکیده

**مقدمه:** یکی از مهم‌ترین مشکلات در مبتلایان به دیابت میکروآلبومینوری است. در واقع میکروآلبومینوری ساده‌ترین و حساس‌ترین فاکتور برای ارزیابی خطر و مشخص کردن بیماری کلیوی در مبتلایان به دیابت است و اگر در مراحل اولیه تشخیص داده شود، می‌توان از بروز و پیشرفت نفروپاتی دیابتی جلوگیری به عمل آورد. هلیکوباکتر پیلوری یکی از عوامل عفونت‌زا در کل جامعه و به خصوص در بیماران مبتلا به دیابت، به دلیل سطح ایمنی پایین‌تر، می‌باشد. بر مبنای بعضی از گزارش‌ها ژنوتیپ cagA مثبت از هلیکوباکتر پیلوری به عنوان عامل مؤثر در ایجاد میکروآلبومینوری قلمداد شده است. هدف مطالعه‌ی حاضر، بررسی ارتباط ژن ویرولانس cagA هلیکوباکتر پیلوری با میکروآلبومینوری در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو بود.

**روش‌ها:** در این مطالعه ۸۸ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو مراجعه کننده به مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان بررسی شدند که ۶۰ نفر از آن‌ها بیماران دچار دیابت نوع دو مبتلا به میکروآلبومینوری و ۲۸ نفر بیماران مبتلا به دیابت نوع دو بدون میکروآلبومینوری بودند. نمونه‌های مدفوع از بیماران و افراد شاهد جمع‌آوری گردید و پس از استخراج DNA برای بررسی نمونه‌ها از لحاظ عفونت با هلیکوباکتر پیلوری Nested PCR و سپس ژنوتایپینگ با پرایمرهای اختصاصی cagA انجام شد.

**یافته‌ها:** از کل نمونه‌ها ۱۶ نفر(۱۸/۲ درصد) آلوده به هلیکوباکتر پیلوری بودند که ۱۲ نفر (۷۵ درصد) از گروه بیماران دچار دیابت نوع دو مبتلا به میکروآلبومینوری و ۴ نفر (۲۵ درصد) از گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع دو بدون میکروآلبومینوری بودند. ۳ نمونه (۱۸/۸ درصد) دارای ژن cagA بودند که هر سه نفر از گروه افراد دچار دیابت نوع دو مبتلا به میکروآلبومینوری بودند. ارتباط بین ژن cagA هلیکوباکتر پیلوری و میکروآلبومینوری در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو از نظر آماری معنی‌دار نبود (P = ۰/۰۸).

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه اگر چه شیوع میکروآلبومینوری در افراد با ژنوتیپ +cagA هلیکوباکترپیلوری بیش از افرادی بود که از لحاظ ژنوتیپ هلیکوباکتر پیلوری –cagA بودند، اما در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو ارتباط معنی‌داری بین ژن cagA هلیکوباکتر پیلوری و میکروآلبومینوری نبود.

**واژگان کلیدی:** هلیکوباکتر پیلوری، cagA، میکروآلبومینوری، دیابت نوع دو، DNA مدفوع

## مقدمه

دیابت یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های متابولیک در جهان و پنجمین عامل مرگ و میر در جوامع غربی می‌باشد. شیوع دیابت در ایران۴/۵ تا ۶ درصد گزارش شده است (۱). دیابت باعث عوارض متعددی نظیر نابینایی، بیماری‌های قلبی و کلیوی می‌شود (۲). یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی که افراد دچار دیابت نوع دو به آن مبتلا می‌شوند دفع آلبومین در ادرار یا میکروآلبومینوری است (۳). در واقع بروز میکروآلبومینوری به عنوان نشانگری حساس برای نشان دادن و ارزیابی خطر نفروپاتی دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت است (۴).

[۱] کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
[۳] استاد، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۴] دانشیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
**نویسنده‌ی مسؤول**: دکتر رسول صالحی
Email: r_salehi@med.mui.ac.ir

اگر چه هلیکوباکتر پیلوری به عنوان عامل ایجادکننده‌ی گاستریت و سرطان معده شناخته شده ولی بر مبنای بعضی از گزارش‌ها ژنوتیپ‌های خاصی از هلیکوباکتر پیلوری به عنوان یکی از عواملی که می‌تواند ایجاد میکروآلبومینوری کند نیز معرفی شده است (۶-۵). ژنوتیپ‌هایی از هلیکوباکتر پیلوری که به عنوان عوامل مؤثر در ایجاد میکروآلبومینوری قلمداد شده‌اند دارای ژن‌های بیماری‌زای مهمی همچون vacA و cagA هستند (۸-۷).

CagA یک کاست ژنی بیماری‌زا است که در سال ۱۹۸۹ کشف شد (۹). حدود ۶۰ درصد از انواع هلیکوباکتر پیلوری دارای ژن cagA هستند (۱۰، ۷). هیچ ژن مشابه با cagA در هلیکوباکتر پیلوری و یا سایر باکتری‌ها وجود ندارد. cagA حاوی ژن‌هایی است که سیستم ترشحی نوع چهار را کد می‌کنند.

این ژن می‌تواند باعث افزایش سایتوکاین‌های التهابی نظیر اینترلوکین ۱، ۶ و ۸ و همچنین TNFα (Tumor necrosis factor alpha) و VPGF (Vascular permeability growth factor) شود (۹-۸). این سایتوکاین‌های التهابی با خروج آلبومین در ادرار و میکروآلبومینوری رابطه دارند. در واقع سایتوکاین‌های التهابی نفوذپذیری عروق را افزایش می‌دهند و تغییر نفوذپذیری غشای گلومرولی باعث خروج آلبومین می‌گردد (۱۲-۱۱).

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 هلیکوباکتر پیلوری هستند و با توجه به اهمیت تشخیص زودهنگام میکروآلبومینوری در پیش‌گیری از نفروپاتی دیابتی بر آن شدیم تا در این مطالعه ارتباط ژن ویرولانس cagA هلیکوباکتر پیلوری را با میکروآلبومینوری در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان بررسی کنیم.

## روش‌ها

در این مطالعه ۸۸ نمونه‌ی مدفوع افراد مبتلا به دیابت نوع دو مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان جمع‌آوری شد. معیارهای ورود به مطالعه برای دو گروه بیمار مورد مطالعه همسان بودن آماری سن، جنس، بیماری قلبی، فشار خون، مصرف دخانیات، میزان تری‌گلیسرید (TG)، هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1C)، LDL (Low density lipoprotein)، HDL (High density lipoprotein) و شاخص توده‌ی بدنی (Body mass index یا BMI) و همچنین عدم استفاده از آنتی‌بیوتیک و یا هر گونه درمان دیگر برای هلیکوباکتر پیلوری بود.

۶۰ نفر از افراد مورد بررسی، بیمار مبتلا به دیابت نوع دوی دچار میکروآلبومینوری و ۲۸ نفر بیماران مبتلا به دیابت نوع دو بدون میکروآلبومینوری بودند. در صورتی بیمار مبتلا به میکروآلبومینوری تلقی می‌شد که در دو نمونه‌ی ادرار در طی سه ماه گذشته نسبت آلبومین به کراتینین ۳۰۰-۳۰ به دست می‌آمد.

پس از فراخوان افراد مورد نظر، نمونه‌های مدفوع در ظروف مخصوص جمع‌آوری و تا زمان استفاده برای استخراج DNA در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج DNA از نمونه‌های مدفوع، با استفاده از کیت استخراج DNA، کیاژن (QIAamp stool mini Kit) و مطابق دستورالعمل آن صورت گرفت. DNAهای استخراج شده، پس از



www.mui.ac.ir

انجام آنالیزهای کمی و کیفی، در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد تا مراحل بعدی آزمایش انجام شود.

کلیه‌ی DNAهای استخراج شده از نمونه‌ی مدفوع برای اطمینان از عدم وجود ممانعت‌کننده‌ی Polymerase chain reaction (PCR) با استفاده از پرایمرهای مخصوص ۱۶S rRNA تکثیر شد. واکنش PCR، در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر buffer ۱۰x، ۲۰۰ میلی‌مول dNTPs، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۲/۵ واحد Taq DNA، ۱۰۰ نانوگرم DNA polymerase و ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرهای F و R انجام شد (جدول ۱).

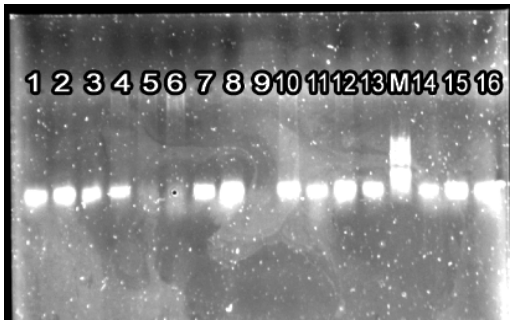
سپس Nested PCR، جهت جداسازی هلیکوباکتر پیلوری، در حجم ۲۵ میکرولیتر، ۵ میکرولیتر buffer ۱۰x، ۲۰۰ میلی‌مول dNTPs، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۲/۵ واحد Taq polymerase، ۱۰۰ نانوگرم DNA و ۱۰ پیکومول از پرایمر خارجی (برای دور اول) و پرایمر داخلی به همراه ۳ میکرولیتر از محصول PCR مرحله‌ی اول برای دور دوم انجام شد (جدول ۱). بررسی وجود ژن cagA طبق روش فلسفی و همکاران انجام گرفت (۵). محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی گردید.

## یافته‌ها

با به کارگیری کیت استخراج DNA از مدفوع (QIA amp, Germany)، میزان DNA به دست آمده‌ی قابل تکثیر با PCR و پرایمرهای مخصوص 16S rRNA، ۹۲ درصد محاسبه شد (شکل ۱).

**جدول ۱. پرایمرهای به کار رفته و برنامه‌های PCR (Polymerase chain reaction)**

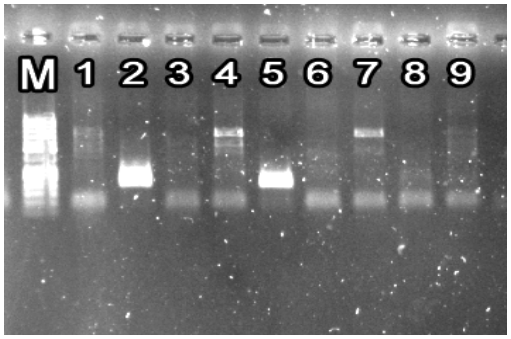
| ژن هدف | توالی پرایمر | اندازه‌ی محصول (bp) | شرایط PCR |
|---|---|---|---|
| 16srRNA | 5'-CCTACGGGAGGCAGCAGTAG-3'<br>5'-CAACAGAGCTTTACGATCCGAAA-3' | ۵۰۰ | ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ دقیقه (۱ دور)،۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه (۳۵ دور)، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه (۱ دور) |
| H.pylori UreC gene | دور اول:<br>5'-AAGCCTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3'<br>5'-AAGCCTACTTTCTAACACTAACGC-3'<br>دور دوم:<br>5'-CTTTCTTCTCAAGCAATTGTC-3'<br>5'-CAAGCCATCGCCGGTTTTAGC-3' | ۲۵۰ | دور اول:<br>۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ دقیقه (۱ دور)، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ دقیقه (۱ دور)<br>دور دوم:<br>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) |
| cagA | 5'-AATACACCAACGCCTCCA-3'<br>5'-TTGTTGCCGCTTTTGCTCTC-3' | ۴۰۰ | ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۴ دقیقه (۱ دور)، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۵۹ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه (۳۵ دور)، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱۰ دقیقه (۱ دور) |



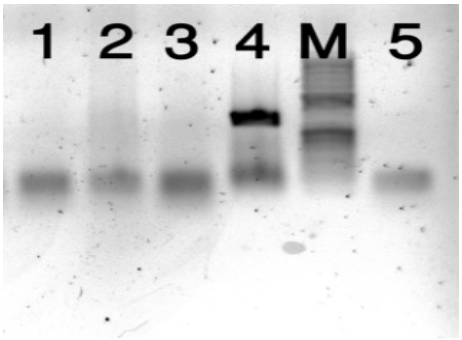

**شکل ۱. محصول PCR (Polymerase chain reaction) با استفاده از پرایمرهای مخصوص ژن 16s rRNA بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد**
**ردیف‌های شماره‌ی ۵، ۶ و ۹ نمونه‌هایی را نشان می‌دهند که DNA استخراج شده از نمونه‌ی مدفوع بیماران قابل تکثیر با روش PCR نبوده است. M = نشانگر وزن مولکولی ۵۰ bp**

برای نمونه‌هایی که قابلیت تکثیر نداشتند فرایند کار تکرار و یا نمونه‌ی دیگری جایگزین آن‌ها گردید. میزان شیوع هلیکوباکتر پیلوری با روش PCR و پرایمرهای UreC در نمونه‌ی مدفوع بیماران مبتلا به دیابت نوع دو که در این مطالعه شرکت نمودند ۱۸/۲درصد به دست آمد ( شکل ۲). میزان شیوع ژن cagA در نمونه‌های هلیکوباکتر پیلوری مثبت ۱۸/۸ درصد بود (شکل ۳).

در این مطالعه ۸۸ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو بررسی شدند که ۶۰ نفر (۶۸/۲ درصد) از آن‌ها مبتلا




**شکل ۲. محصول PCR (Polymerase chain reaction) با استفاده از پرایمرهای UreC 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 (Polymerase chain reaction) با استفاده از پرایمرهای cagA بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد**
**ردیف شماره‌ی ۴ نمونه‌ای دارای ژن cagA را نشان می‌دهد.**

به میکروآلبومینوری و ۲۸ نفر (۳۱/۸ درصد) بدون میکروآلبومینوری بودند. از کل نمونه‌ها ۱۶ نفر (۱۸/۲ درصد) دارای عفونت هلیکوباکتر پیلوری بودند که ۱۲ نفر (۷۵ درصد) آنان مبتلا به میکروآلبومینوری بودند و از بین ۱۶ نمونه‌ی هلیکوباکتر پیلوری مثبت، ۳ نمونه (۱۸/۸ درصد) دارای ژن cagA بودند که هر سه نفر از گروه افراد مبتلا به دیابت نوع دوی دچار میکروآلبومینوری بودند. طبق نتایج به دست آمده در جمعیت مورد مطالعه‌ی ما و با روش اتخاذ شده، با وجود این که میکروآلبومینوری در افراد دارای عفونت هلیکوباکتر پیلوری، بیشتر از افرادی بود که این عفونت را نداشتند، اما از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین میکروآلبومینوری و عفونت هلیکوباکتر پیلوری به دست نیامد (P = ۰/۵۲).

همچنین نتایج نشان داد که بروز میکروآلبومینوری در افراد cagA مثبت بیشتر از افراد cagA منفی است. ولی از نظر آماری رابطه‌ی بین میکروآلبومینوری و cagA معنی‌دار نبود (P = ۰/۰۸)، (جدول ۲).

در این مطالعه فراوانی میکروآلبومینوری در بیماران جوان‌تر (بین ۳۰ تا ۴۰ سال) بیشتر از بیماران با سن بالاتر بود (P = ۰/۰۲).



www.mui.ac.ir

**جدول ۲. توزیع فراوانی میکروآلبومینوری بر حسب cagA در افراد مبتلا به هلیکوباکترپیلوری**

| میکروآلبومینوری | CagA- | CagA+ |
|---|---|---|
| مثبت | ۹ (۶۹/۲) | ۳ (۱۰۰) |
| منفی | ۴ (۳۰/۸) | ۰ (۰) |
| جمع | ۱۳ | ۳ |

همچنین نتایج نشان داد که میانگین HDL بین افراد مبتلا به میکروآلبومینوری و بدون میکروآلبومینوری از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت (P = ۰/۹۹). میانگین LDL و TG در افراد مبتلا به میکروآلبومینوری بیشتر بود ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۳).

**جدول ۳. میانگین متغیرهای کمی مختلف بر حسب میکروآلبومینوری**

| متغیر | با میکروآلبومینوری (انحراف معیار ± میانگین) | بدون میکروآلبومینوری (انحراف معیار ± میانگین) | مقدار P |
|---|---|---|---|
| سن (سال) | ۴۸/۸ ± ۷/۵ | ۵۴ ± ۹/۸ | ۰/۰۲ |
| HDL (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) | ۴۱/۸ ± ۱۱/۶ | ۴۱/۹ ± ۹/۰۲ | ۰/۹۹ |
| LDL (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) | ۱۰۵/۲ ± ۳۵/۲ | ۹۵/۴ ± ۳۲/۶ | ۰/۱۲ |
| TG (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) | ۱۵۹/۸ ± ۸۸/۷ | ۱۳۶/۸ ± ۵۲/۹ | ۰/۱۱ |
| فشار خون سیستول (میلی‌متر جیوه) | ۱۱/۸ ± ۱/۳۶ | ۱۱/۸۱ ± ۱/۵ | ۰/۹۸ |
| فشار خون دیاستول (میلی‌متر جیوه) | ۷/۲ ± ۰/۹۵ | ۷/۴ ± ۰/۸۶ | ۰/۵۳ |

HDL: High density lipoprotein
LDL: Low density lipoprotein
TG: Triglyceride

جدول ۴ رابطه‌ی بین جنس و میکروآلبومینوری را نشان می‌دهد. نتایج بیان‌گر آن بود که در جمعیت مورد مطالعه‌ی ما، بین جنس و میکروآلبومینوری از نظر آماری رابطه‌ی معنی‌دار وجود داشت ( P = ۰/۰۳).

همچنین زنان بیشتر از مردان در معرض عفونت با هلیکوباکتر پیلوری بودند (P = ۰/۰۴)، (جدول ۵).

**جدول ۴. توزیع فراوانی میکروآلبومینوری به تفکیک جنس**

| میکروآلبومینوری | زنان (درصد) تعداد | مردان (درصد) تعداد |
|---|---|---|
| منفی | ۱۴ (۲۵/۹) | ۱۴ (۴۱/۲) |
| مثبت | ۴۰ (۷۴/۱) | ۲۰ (۵۸/۸) |
| جمع | ۵۴ (۱۰۰) | ۳۴ (۱۰۰) |

**جدول ۵. توزیع فراوانی هلیکوباکتر پیلوری بر حسب جنس**

| هلیکوباکترپیلوری | زنان (درصد) تعداد | مردان (درصد) تعداد |
|---|---|---|
| مثبت | ۱۲ (۲۲/۲) | ۴ (۱۱/۸) |
| منفی | ۴۲ (۷۷/۸) | ۳۰ (۸۸/۲) |
| جمع | ۵۴ (۱۰۰) | ۳۴ (۱۰۰) |

## بحث

نفروپاتی دیابتی یکی از مهم‌ترین عوامل نقص در عملکرد فیزیولوژیک کلیه‌ها، در بیماری دیابت ملیتوس و شایع‌ترین علت نارسایی پیشرفته‌ی کلیه است و در اصل ۳۰ درصد از موارد نارسایی کلیه را تشکیل می‌دهد. این بیماری با دفع پروتئین از ادرار، فشار خون بالا و نارسایی پیشرفته‌ی کلیه مشخص می‌شود (۱۴-۱۳).

نفروپاتی دیابتی مراحل مختلفی را طی می‌کند که به ترتیب شامل افزایش فیلتراسیون گلومرولی، میکروآلبومینوری، ماکروپروتئینوری و نارسایی پیشرفته‌ی کلیه است (۱۴).

میکروآلبومینوری مرحله‌ای از مشکلات کلیوی دیابت است که مدت‌ها قبل از بروز نفروپاتی بالینی به وقوع می‌پیوندد و پیش‌بینی‌کننده‌ی نارسایی کلیه در آینده می‌باشد. در واقع میکروآلبومینوری ساده‌ترین و حساس‌ترین فاکتور برای نشان دادن و ارزیابی خطر و

مشخص کردن بیماری کلیوی در مبتلایان به دیابت است. درمان اصلی نفروپاتی دیابتی پیشگیری است و میکروآلبومینوری باید در مراحل اولیه تشخیص داده شود تا با کنترل بهتر قند خون و انجام اقدامات دارویی از پیشرفت بیماری کلیوی جلوگیری به عمل آید. بنابراین بررسی عوامل مرتبط با آن برای پایه‌گذاری راه‌های مؤثر و برجسته در جهت پیشگیری ضروری است (۴، ۱).

برخی مطالعات نشان می‌دهند که عفونت با هلیکوباکترپیلوری می‌تواند سبب افزایش تولید سایتوکین‌هایی نظیر IL-1، TNFα و VPGF شود. این سایتوکین‌های التهابی می‌توانند باعث تغییر نفوذپذیری غشای گلومرولی و خروج آلبومین و ایمنوگلوبین‌ها در ادرار گردند. در حقیقت این سایتوکاین‌های التهابی در عفونت با سویه‌های cagA+ هلیکوباکتر پیلوری تحریک می‌شوند و می‌توانند فرایند التهابی گلومرونفریت و پروتئینوری را القا کنند (۱۱). کاست ژنی cag pathogenicity island (cag-PAI) در هلیکوباکتر پیلوری حاوی ۲۹ ژن می‌باشد که ساختار ترشحی نوع چهار را کد می‌نمایند و قادر هستند پروتئین ۱۲۰ کیلودالتونی cagA را به داخل سلول‌های اپیتلیال معده‌ی میزبان منتقل نمایند. cagA پس از ورود به داخل سلول‌های اپیتلیال معده‌ی میزبان، فسفوریله می‌شود و به HSP-2 تیروزین فسفات باند می‌گردد که باعث ایجاد یک پاسخ سلولی شبیه فاکتور رشد و تولید سایتوکاین توسط میزبان می‌گردد (۱۵).

در افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری مقادیر اینترلوکین‌های IL-1β، IL-2، IL-6، IL-8 و TNFα افزایش می‌یابد (۱۵). در این فرایند التهابی اینترلوکین ۸ نقش محوری به عهده دارد. نشان داده شده است که سوش‌هایی از هلیکوباکتر پیلوری که دارای cag-PAI هستند به مراتب پاسخ شدیدتری را در رابطه با اینترلوکین ۸ نشان می‌دهند. این پاسخ در رابطه با فعال‌سازی NF-KB و AP-1 می‌باشد (۱۵). القای مداوم پاسخ التهابی عامل خطرساز مهمی در بروز مشکلات کلیوی و آرترواسکلروز می‌باشد. عنوان می‌شود که ضایعات آندوتلیالی وسیعی که در بیماران مبتلا به دیابت با عفونت هلیکوباکتر پیلوری و میکروآلبومینوری دیده می‌شود می‌تواند به علت ژنوتیپ cagA+ هلیکوباکتر پیلوری باشد (۱۶). آنتی‌بادی ضد cagA که در این افراد شکل می‌گیرد می‌تواند با آنتی‌ژن‌های آندوتلیال واکنش دهد که ضایعات عروق را به همراه خواهد داشت که خود باعث نشت آلبومین می‌گردد (۱۶).

اختلالات ایمنی متعدد، به خصوص اختلال ایمنی همورال و سلولار در بیماران مبتلا به دیابت، منجر به پیشبرد عفونت‌های مزمنی نظیر هلیکوباکتر پیلوری در این بیماران می‌شود. همچنین کاهش حرکت دستگاه گوارش در بیماران مبتلا به دیابت می‌تواند کلونیزاسیون و رشد باکتریایی را در این بیماران افزایش دهد (۱۱).

هلیکوباکتر پیلوری شایع‌ترین باکتری می‌باشد که جوامع انسانی را در بعد جهانی مبتلا به عفونت ساخته است. شیوع این باکتری در ایران ۹۲-۸۲ درصد گزارش شده است (۱۷). در خصوص شیوع هلیکوباکتر پیلوری در افراد مبتلا و غیرمبتلا به دیابت نوع دو در دیابتی جامعه گزارش‌های متفاوتی وجود دارد. در مطالعه‌ای در ترکیه تفاوت بین افراد مبتلا و غیر مبتلا به دیابت از نظر عفونت هلیکوباکتر پیلوری معنی‌دار به دست نیامد (۱۸). یافته‌ی جالب توجه در



www.mui.ac.ir

این مطالعه ارتباط بین عفونت هلیکوباکتر پیلوری در افراد مبتلا به دیابت با نوروپاتی بود ولی ارتباطی با نفروپاتی دیده نشد. این در صورتی است که اختلاف بین زنان مبتلا و غیر مبتلا به دیابت از نظر عفونت هلیکوباکتر پیلوری در جمعیت مورد مطالعه در ایتالیا معنی‌دار گزارش شده ولی در مورد مردان اختلافی مشاهده نشده است (۱۹). نتایج این مطالعه مؤید اهمیت جنسیت در میزان ابتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری است. در مطالعه‌ی ما نیز شیوع بالاتری از نظر عفونت هلیکوباکتر پیلوری در زنان به دست آمد.

در مطالعه‌ای جدیدتر در مورد ارتباط عفونت هلیکوباکتر پیلوری و میکروآلبومینوری در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو در ترکیه، شیوع میکروآلبومینوری در بیماران مبتلا به دیابت همراه با عفونت هلیکوباکتر پیلوری بیشتر و از نظر آماری در مقایسه با بیماران مبتلا به دیابت نوع دو غیر آلوده به هلیکوباکتر پیلوری معنی‌دار به دست آمده است (۲۰). با توجه به این که نشانگرهای التهابی در بیماران مبتلا به دیابت همراه با عفونت هلیکوباکتر پیلوری به صورت معنی‌داری بالاتر بوده است، آن‌ها چنین نتیجه‌گیری نمودند که عفونت هلیکوباکتر پیلوری چون باعث پاسخ التهابی سیستمیک می‌گردد، می‌تواند عاملی برای پیشرفت نفروپاتی دیابتی یا ایجاد آن قلمداد گردد (۲۰).

با توجه به مطالعه‌ای که در اصفهان بر روی ژنوتیپ‌های مختلف هلیکوباکتر پیلوری در بیماران دچار دیابت نوع دوی مبتلا یا غیر مبتلا به میکروآلبومینوری انجام پذیرفت، مشخص شد که ژنوتیپ vacA ارتباطی با میکروآلبومینوری ندارد ولی نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد احتمال ارتباط ژنوتیپ cagA با عارضه‌ی میکروآلبومینوری بسیار محتمل است و در صورتی که تعداد نمونه‌ها افزایش یابد، ممکن است در بیماران ما این ارتباط معنی‌دار به دست آید (۲۱). این مسأله نشان‌گر این حقیقت است که عفونت هلیکوباکتر پیلوری نه به صورت کلی، بلکه در رابطه با ژنوتیپ‌های خاصی از باکتری در بروز میکروآلبومینوری ایفای نقش می‌نماید. ارتباط معنی‌دار ژنوتیپ cagA هلیکوباکتر پیلوری و میکروآلبومینوری در بعضی از مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (۱۶، ۱۱).

در خصوص شیوعی که برای عفونت هلیکوباکتر پیلوری در مطالعه‌ی ما به دست آمد (۱۸/۲ درصد)، به نظر می‌رسد که جمعیت مورد مطالعه و استفاده از نمونه‌ی مدفوع می‌تواند اثرگذار باشد. در مطالعه‌ای که در شهر اصفهان در کودکان ۱ تا ۷ سال در مناطق پرجمعیت و کم جمعیت شهر انجام پذیرفت، شیوع هلیکوباکتر پیلوری به ترتیب ۶۴ و ۳۱ درصد گزارش شد (۲۲). از طرفی در مطالعه‌ای که در فرانسه بر روی نمونه‌ی مدفوع بیماران انجام گرفت، شیوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری ۲۵/۴ درصد گزارش گردید (۲۳).

در مطالعه‌ی حاضر جمعیت مورد مطالعه به صورت تصادفی از جامعه انتخاب نشده بودند و مطالعه تنها بر روی بیماران مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان انجام شد. به همین دلیل احتمال دارد شیوع پایین هلیکوباکتر پیلوری به این علت باشد که نمونه به صورت تصادفی از افرادی بوده که عفونت هلیکوباکتر پیلوری در آن‌ها نظیر مناطق کم جمعیت اصفهان پایین بوده است و یا این که نظیر مطالعه‌ای که در فرانسه انجام شد (۲۳)، استفاده از نمونه‌ی مدفوع در به دست آوردن چنین نتیجه‌ای تأثیر داشته است.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که عفونت

هلیکوباکتر پیلوری در بیماران مبتلا بـه دیابـت نـوع ۲ دچار میکروآلبومینوری شیوع بالاتری داشت. همچنین تمامی نمونه‌های cagA مثبت از گروه بیماران مبتلا بـه میکروآلبومینوری بود. به نظر مـی‌رسـد، انجـام چنـین مطالعه‌ای در حجم نمونه‌ی به مراتب بالاتر لازم اسـت و می‌تواند به جمع‌بندی قطعـی‌تـر یافتـه‌هـا و کـاربرد بالینی آن‌ها منجر گردد.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسؤولین محترم مرکز تحقیقات غـدد و متابولیسم اصفهان که عهده‌دار حمایت مالی این طـرح بوده‌انـد و پرسـنل محتـرم مرکـز فـوق و نیـز کلیـه‌ی بیمارانی که در این پژوهش با رضـایت کامـل شـرکت نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

## References

1. Afkhami-Ardekani M, Modarresi M, Amirchagmaghi E. Microalbuminuria and its risk factors in patients with type 2 diabetes. Iran J Diabetes Lipid Disord 2004; 3(1): 47-53.
2. Engelgau MM, Narayan KM, Herman WH. Screening for type 2 diabetes. Diabetes Care 2000; 23(10): 1563-80.
3. Mogensen CE. Microalbuminuria and hypertension with focus on type 1 and type 2 diabetes. J Intern Med 2003; 254(1): 45-66.
4. Rossi MC, Nicolucci A, Pellegrini F, Comaschi M, Ceriello A, Cucinotta D, et al. Identifying patients with type 2 diabetes at high risk of microalbuminuria: results of the DEMAND (Developing Education on Microalbuminuria for Awareness of reNal and cardiovascular risk in Diabetes) Study. Nephrol Dial Transplant 2008; 23(4): 1278-84.
5. 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.
6. 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.
7. van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, van Asbroek M, Sousa JC, et al. Typing of Helicobacter pylori vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization. J Clin Microbiol 1998; 36(5): 1271-6.
8. Ribeiro ML, Godoy AP, Benvengo YH, Mendonca S, Pedrazzoli JJr. Clinical relevance of the cagA, vacA and iceA genotypes of Helicobacter pylori in Brazilian clinical isolates. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 36(3): 181-5.
9. Blaser MJ, Atherton JC. Helicobacter pylori persistence: biology and disease. J Clin Invest 2004; 113(3): 321-33.
10. Sicinschi LA, Correa P, Bravo LE, Schneider BG. A positive assay for identification of cagA negative strains of Helicobacter pylori. J Microbiol Methods 2003; 55(3): 625-33.
11. Ibrahim A, Zaher T, Ghonemy TA, l-Azim SA, l-Azim MA, amadan 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.
12. Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. Clin Sci (Lond) 2005; 109(2): 143-59.
13. Rashki Kemmak M, Gol A, Dabiri SH. Preventive Effects of Garlic Juice on Renal Damages Induced by Diabets Melitus in Rats. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism 2009; 11(3): 331-9.
14. Talaei A, Jabari S, Bigdeli MH, Farahani H, Siavash M. Correlation of microalbuminuria and urinary copper in type two diabetic patients. Indian J Endocrinol Metab 2011; 15(4): 316-9.
15. Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. N Engl J Med 2002; 347(15): 1175-86.
16. Pietroiusti A, Giuliano M, Magrini A, Bergamaschi A, Galante A. Cytotoxin-associated gene A strains of Helicobacter pylori represent a risk factor for the development of microalbuminuria in type 2 diabetes. Diabetes Care 2006; 29(6): 1399-401.
17. Farshad S, Alborzi A, bbasian A. Association of H. pylori virulence genes CagA, VacA and UreAB with ulcer and nonulcer diseases in Iranian population. Pak J Biol Sci 2007; 10(8): 1185-9.
18. Demir M, Gokturk HS, Ozturk NA, Kulaksizoglu M, erin E, ilmaz U. Helicobacter pylori prevalence in diabetes mellitus patients with dyspeptic symptoms and its relationship to glycemic control and late complications. Dig Dis Sci 2008; 53(10): 2646-9.



www.mui.ac.ir

**19.** Quadri R, Rossi C, Catalfamo E, Masoero G, Lombardo L, Della Monica P, et al. Helicobacter pylori infection in type 2 diabetic patients. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2000; 10(5): 263-6.
**20.** Tanriverdi O. Association of Helicobacter pylori infection with microalbuminuria in type 2 diabetic patients. Turk J Gastroenterol 2011; 22(6): 569-74.
**21.** Abdollahi L, Zolfaghari MR, Amini M, Salehi R. The relation between microalbuminuria and Helicobacter pylori vacA gene in type 2 diabetic patients, Isfahan, Iran. J Isfahan Med Sch 2012; 30(179): 228-37.
**22.** Mokhtari M. Evaluation of antibody of Helicobacter pylori infection in preschool children in Isfahan. Iranian Journal of Gastroentrology 2002; 36: 33-8.
**23.** 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.

**Journal of Isfahan Medical School** Original Article
**Vol. 30, No. 193, 3rd week, August 2012** Received: 16.2.2012 Accepted: 26.6.2012

# The Relation of Microalbuminuria and Helicobacter Pylori cagA Gene in Patients with Type 2 Diabetes

Zahra Mollabashi MSc[1], Mohammad Reza Zolfaghari PhD[2], Masoud Amini MD[3], Rasoul Salehi MD[4]

## 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 an important indication for development of diabetic nephropathy. The prevalence of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes has been estimated to be 47%. Since the disorder initiates with microalbuminuria, early detection and prevention are of vital importance. Helicobacter pylori infection is more prevalent in diabetic patients due to their low immune tolerance. The cagA positive genotype is reported to be effective in microalbuminuria development in type 2 diabetic patients. In this study, we investigated the relation of H. pylori cagA virulence factor with microalbuminuria in patients with type 2 diabetes.

**Methods:** This study included 88 patients with type 2 diabetes. Microalbuminuria was present in 60 subjects and absent in the other 28. Stool samples were collected from all patients and DNA was extracted using QIAamp DNA Stool Mini Kit. 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%) and 4 (25%) did not. CagA positivity was detected in 3 subjects who belonged to the group with microalbuminuria.

**Conclusion:** In the population studied and the sample size used, no correlation was found between cagA gene and microalbuminuria in patients with type 2 diabetes.

**Keywords:** Helicobacter pylori, CagA genotype, Microalbuminuria, Type 2 diabetes, Stool DNA

[1] Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran.
[3] Professor, Endocrine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[4] Associate Professor, Department of Anatomy and Molecular Biology, School of Medicine And Pediatric Diseases Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
**Corresponding Author:** Rasoul Salehi MD, Email: r_salehi@med.mui.ac.ir