مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۱۷۹/هفته اول اردیبهشت ماه ۱۳۹۱
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۲۰

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

لطیفه عبداللهی[۱]، دکتر محمدرضا ذوالفقاری[۲]، دکتر مسعود امینی[۳]، دکتر رسول صالحی[۴]

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 میکرو آلبومینوری 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 پلیمراز، دیابت نوع دو، میکروآلبومینوری

مقدمه

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 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

[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، بخش ژنتیک، 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.ac.ir

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). بروز 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 نفروپاتی 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 (۹-۸). 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 ویرولانس مهم که در حدود ۵۰ درصد از H.pyloriها وجود دارد، کاست ژنی به نام VacA (Vacuolating cytotoxin A) است که باعث ایجاد واکوئل در سلول‌های پستانداران می‌شود و در نهایت به مرگ سلول منجر می‌گردد (۱۲-۱۱). 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 نفروپاتی دیابتی، بر آن شدیم تا ارتباط ژن ویرولانس هلیکوباکتر 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

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 مبتلابه 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 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 کیاژن (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

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

ژن هدف	شرایط PCR	اندازه‌ی محصول (bp)	توالی پرایمر (Primer sequences)
16srRNA	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)	۵۰۰	5′-CCTACGGGAGGCAGCAGTAG-3′ 5′-CAACAGAGCTTTACGATCCGAAA-3′
H. pylori UreC gene	دور اول: 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: 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)	۲۵۰	دور اول: 5′-AAGCCTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3′ 5′-AAGCCTACTTTCTAACACTAACGC-3′ دور دوم: 5′-CTTTCTTCTCAAGCAATTGTC-3′ 5′-CAAGCCATCGCCGGTTTTAGC-3′
VacA (s)	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)	S1 = ۲۵۹ S2 = ۲۸۶	5′-ATGGAAATACAACAAACACAC-3′ 5′-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3′
VacA (m)	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)	M1 = ۵۷۰ M2 = ۶۴۲	5′-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3′ 5′-GCGTCTAAATAATTCCAAGG-3′

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 $MgCl_2$، ۲/۵ واحد Taq DNA polymerase، ۱۰۰ نانوگرم DNA و ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرهای F و R انجام شد (جدول ۱).

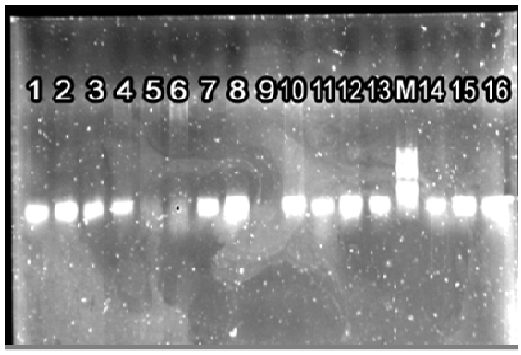
سپس Nested PCR جهت جداسازی H.pylori انجام شد (در حجم ۲۵ میکرولیتر، ۵ میکرولیتر ۱۰ x buffer، ۲۰۰ میلی‌مول dNTPs، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۲/۵ واحد Taq polymerase، ۱۰۰ نانوگرم DNA و ۱۰ پیکومول از پرایمر خارجی (برای دور اول) و پرایمر داخلی به همراه ۳ میکرولیتر از محصول PCR مرحله‌ی اول برای دور دوم) (جدول 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).

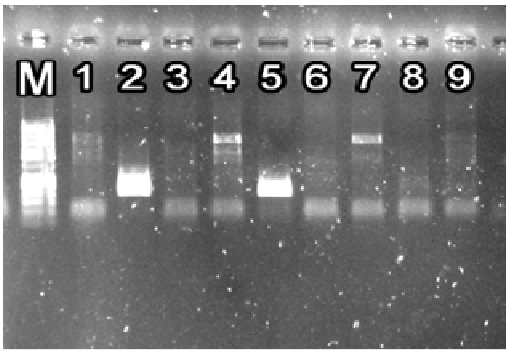
همچنین میزان +VacA در جمعیت مورد مطالعه، ۶/۲۵ درصد به دست آمد (شکل ۳).



شکل ۱. محصول PCR با استفاده از پرایمرهای مخصوص ژن 16srRNA بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

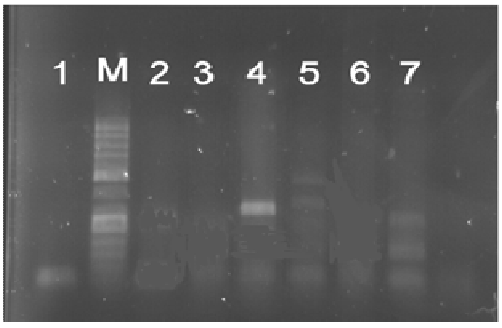
ردیف‌های شماره‌ی ۵، ۶ و ۹ نمونه‌هایی را نشان می‌دهند که DNA استخراج شده از نمونه‌ی مدفوع بیماران قابل تکثیر با روش PCR نبوده است.

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.

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 χ^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 (درصد) تعداد	با میکروآلبومینوری (درصد) تعداد
مثبت	۱ (۲۵)	۰ (۰)
منفی	۳ (۷۵)	۱۲ (۱۰۰)
جمع	۴ (۱۰۰)	۱۲ (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 میکرو آلبومینوری بودند (P < ۰/۰۳) (جدول ۴).

همچنین زنان بیشتر از مردان در معرض عفونت با H.pylori تشخیص داده شدند (P < ۰/۰۴) (جدول ۵).

در این مطالعه فراوانی میکروآلبومینوری در بیماران جوان‌تر (بین ۳۰ تا ۴۰ سال) بیشتر از بیماران با سن بالاتر بود (P < ۰/۰۲) (جدول ۶).

جدول ۳. مقایسه‌ی میانگین متغییرهای کمی مختلف بر حسب وجود میکروآلبومینوری

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

جدول ۴. توزیع فراوانی میکروآلبومینوری به تفکیک جنس

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

جدول ۵. توزیع فراوانی H.pylori بر حسب جنس

H.pylori	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

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

میکروآلبومینوری	بیشتر از ۶۰ (درصد) تعداد	۶۰-۵۱ سال (درصد) تعداد	۵۰-۴۱ سال (درصد) تعداد	۴۰-۳۰ سال (درصد) تعداد
منفی	۵ (۸۳/۳)	۶ (۲۰)	۷ (۲۸)	۱ (۱۲/۵)
مثبت	۱ (۱۶/۷)	۲۴ (۸۰)	۱۸ (۷۲)	۷ (۸۷/۵)
جمع	1(۱۰۰)۶	۳۰ (۱۰۰)	۲۵ (۱۰۰)	۸ (۱۰۰)

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).

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

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 مسأله 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 درحال توسعه ۸۰ درصد و در کشورهای توسعه یافته ۳۰ درصد گزارش شده است (۱۹).

به نظر می‌رسد حضور هم‌زمان ژن‌های cagA و آلل‌هایی از VacA که دارای فعالیت واکوئله کنندگی 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، TNFα و VEGF (Vascular endothelial growth factor) شود. این سایتوکین‌های التهابی می‌توانند باعث تغییر نفوذپذیری غشای گلومرولی و خروج آلبومین و ایمنوگلوبین‌ها در ادرار شوند. از طرفی باعث فراخوانی پلی‌مورفونوکلئرها می‌گردند (۱۰). VacA باعث تولید TNF_α، IL-1β، αIL–1، IL-6، IL-10 و IL-13 می‌شود (۱۲). نقش سایتوکاین‌های 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

+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 (۲۴-۲۳). از طرفی در برخی مطالعات، همراهی افزایش سایتوکین‌های مختلف با عفونت H.pylori نشان داده شده است (۲۴-۲۳). همچنین ارتباط نارسایی‌های کلیوی با بعضی از اینترلوکین‌ها در مطالعات بسیاری به اثبات رسیده است (۲۴-۲۳).

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

بدین‌وسیله 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.

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 Repiblic 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, Nasseri 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 Gastroentrology 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.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 30, No 179, 1st week, May 2012 Received: 23.12.2011 Accepted: 11.3.2012

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

Latifeh Abdollahi MSc[1], Mohammad Reza Zolfaghari PhD[2], Masoud Amini MD[3], Rasoul Salehi PhD[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 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

[1] Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, 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, Pediatric Inherited Diseases Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Rasoul Salehi MD, Email: r_salehi@med.ac.ir