مقاله پژوهشی

تعیین رابطه بین وقوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری $cagA^+$ و میکروآلبومینوری در بیماران دیابتی نوع ۲

منصوره احراری فر، مجید باصری صالحی*

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی کازرون، کازرون، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۸/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۴/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: میکروآلبومینوری از بیماری‌های متابولیک بوده که مربوط به توسعه نفروپاتی دیابتی است. چندین گزارش از فراوانی بالای وقوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری در بیماران دیابتی وجود دارد. این بدان معناست که احتمالاً در بیماران دیابتی، هلیکوباکتر پیلوری‌cagA مثبت با میکروآلبومینوری در ارتباط است. مطالعه حاضر به‌منظور بررسی رابطه بین هلیکوباکتر پیلوری دارای cagA و میکروآلبومینوری در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو انجام شد.

مواد و روش‌ها: ۷۶ نمونه خون و ادرار از افراد مبتلا به دیابت نوع دو جمع‌آوری شد. از نمونه خون برای ارزیابی قندخون ناشتا، قند خون دوساعته بعد از خوردن صبحانه، هموگلوبین گلیکوزیله، Anti-HpIgG و Anti-HpIgM استفاده شد. درنهایت روش مولکولی برای احراز هویت از سویه موردنظر استفاده و ژنوتایپینگ با پرایمرهای اختصاصی cagA انجام شد. داده‌ها با استفاده از روش آماری مربع کای و فیشر موردبررسی قرار گرفتند.

نتایج: نتیجه به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که هلیکوباکتر پیلوری از ۲۸ نفر (۳۶/۸۴٪) بیماران جدا شد که از بین این بیماران ۲۱ نفر (۷۵٪) مبتلا به میکروآلبومینوری و ۷ نفر (۲۵٪) فاقد میکروآلبومینوری بودند. ۸ نمونه دارای ژن cagA بودند. علاوه بر این، ارتباط معناداری بین ژن cagAی هلیکوباکتر پیلوری و میکروآلبومینوری در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو ازنظر آماری مشاهده نشد$P>0/05$.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو ارتباط معناداری بین ژن cagAی هلیکوباکتر پیلوری و میکروآلبومینوری یافت نشد.

کلمات کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، ژن cagA، میکروآلبومینوری

مقدمه

دیابت یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های متابولیک در جهان و پنجمین عامل مرگ‌ومیر در جوامع غربی است. شیوع دیابت در ایران ۴/۵٪ تا ۶٪ 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). درواقع بروز میکروآلبومینوری به‌عنوان نشانگری حساس برای نشان دادن و ارزیابی خطر نفروپاتی دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت است (۴). اگرچه *هلیکوباکترپیلوری* به‌عنوان عامل ایجادکننده‌ی گاستریت و سرطان معده شناخته‌شده ولی بر مبنای بعضی از گزارش‌ها ژنوتیپ‌های خاصی از *هلیکوباکتر پیلوری* به‌عنوان یکی از عواملی که می‌تواند ایجاد میکروآلبومینوری کند نیز معرفی شده است (۶-۵). ژنوتیپ‌هایی از *هلیکوباکترپیلوری* که به‌عنوان عوامل مؤثر در ایجاد میکروآلبومینوری قلمداد شده‌اند دارای ژن‌های بیماری‌زایی مهمی هم چون *vacA* و *cagA* هستند (۸-۷). *cagA* یک کاست ژنی بیماری‌زا است که در سال ۱۹۸۹ کشف شد (۹). حدود ۶۰٪ از انواع *هلیکوباکترپیلوری* دارای ژن *cagA* هستند (۷، ۱۰). هیچ ژن مشابه با *cagA* در *هلیکوباکترپیلوری* و یا سایر باکتری‌ها وجود ندارد. *cagA* می‌تواند باعث افزایش سایتوکاین‌های التهابی نظیر اینترلوکین ۱، ۶ و ۸ و همچنین TNFα[1] و VPGF[2] شود (۹-۸). این سایتوکاین‌های التهابی با خروج آلبومین در ادرار و میکروآلبومینوری رابطه دارند. درواقع سایتوکاین‌های التهابی

*نویسنده مسئول: **مجید باصری صالحی**، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی کازرون، کازرون، ایران.
Email: Majidbaseri@hotmail.com

1- Tumor necrosis Factor α
2- Vascular Permeability Growth Factor

نفوذپذیری غشای گلومرولی باعث خروج آلبومین می‌گردد (۱۱، ۱۲). کاست ژنی *cagA-PAI*[3] در *هلیکوباکترپیلوری* حاوی ۲۹ ژن است 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، فسفریله می‌شود و به HSP-2 تیروزین فسفات باند می‌گردد که باعث ایجاد یک پاسخ سلولی شبیه فاکتور رشد و تولید سایتوکین توسط میزبان می‌گردد. در افراد آلوده به *هلیکوباکتر پیلوری* مقادیر اینترلوکین‌های TNFα, IL-8, IL-6, IL-2, IL-1ß افزایش می‌یابد. در این فرایندهای التهابی IL-8 نقش محوری به عهده دارد. نشان داده شده است که سوش‌هایی از *هلیکوباکترپیلوری* که دارای *cagA-PAI* هستند به‌مراتب، پاسخ شدیدتری را در رابطه با IL-8 نشان می‌دهند. این پاسخ در رابطه با فعال‌سازی *NF-KB* و *AP-1* است (۱۳). القای مداوم پاسخ التهابی عامل خطرساز مهمی در بروز مشکلات کلیوی و آرترواسکلروز است. عنوان می‌شود که ضایعات آندوتلیالی وسیعی که در بیماران مبتلا به دیابت با عفونت *هلیکوباکترپیلوری* و میکروآلبومینوری دیده می‌شود، می‌تواند به علت ژنوتیپ *cagA+ هلیکوباکتر پیلوری* باشد. 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 (۱۴). اختلالات ایمنی متعدد، به‌خصوص اختلال ایمنی همورال و سلولار در بیماران مبتلا به دیابت، منجر به پیشبرد عفونت‌های مزمنی نظیر *هلیکوباکترپیلوری* 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). با توجه به این‌که 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 *هلیکوباکترپیلوری* را با میکروآلبومینوری در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مرکزی باقرالعلوم (ع) شهرستان کازرون بررسی کنیم.

مواد و روش ها

جمع‌آوری نمونه

مطالعه‌ی حاضر به‌صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۷۶ نمونه خون و بافت معده افراد (زن و مرد ۳۰ سال به بالا) مبتلا به دیابت نوع دو مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مرکزی باقرالعلوم (ع) از خردادماه تا آبان‌ماه ۱۳۹۴ انجام شد. افراد موردمطالعه ازنظر عدم استفاده از آنتی‌بیوتیک و یا هرگونه درمان دیگر برای هلیکوباکترپیلوری موردبررسی قرار گرفتند. لازم به ذکر است بیمارانی که به هر دلیل طی دو ماه گذشته از داروهای گوارشی استفاده نموده بودند از لیست خارج شدند.

غربالگری افراد دیابتی با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی

۱۰ سی‌سی خون وریدی از افراد دیابتی با رعایت شرایط استاندارد جهت انجام آزمایش‌های قند خون ناشتا، هموگلوبین گلیکوزیله گرفته شد و سرم آن به‌وسیله‌ی سانتریفیوژ جدا گردید. از این بیماران دو ساعت بعد از خوردن صبحانه، مجدداً ۲ سی‌سی خون جهت انجام آزمایش قند خون دوساعته گرفته شد. آزمایش‌های قند خون ناشتا و دوساعته‌ی بیماران با استفاده از کیت شرکت من، توسط دستگاه اتوآنالایزر BT3000 با روش کالری‌متری انجام گرفت. به‌علاوه بر روی سرم بیماران آزمایش هموگلوبین گلیکولیزه برای تشخیص میانگین قند خون افراد در طی دو تا سه ماه گذشته، به روش کروماتوگرافی و با استفاده از کیت شرکت بیوسیستم، انجام گرفت.

تشخیص میکروآلبومینوری در افراد دیابتی

ظرف نمونه‌گیری ادرار (۲۴ ساعته) به همراه دستورالعمل روش نمونه‌گیری صحیح به افراد بیمار دیابتی (زن و مرد) داده شد. نمونه‌های گرفته‌شده برای تشخیص میکروآلبومینوری مورد استفاده قرار گرفتند. اندازه‌گیری غلظت آلبومین ادرار به روش ایمونوتوربیدیمتری و با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون صورت گرفت. کراتینین ادرار نیز با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و به روش Jaffe اندازه‌گیری شد. در صورتی بیمار مبتلا به میکروآلبومینوری تلقی می‌شد که در دو نمونه ادرار ۲۴ ساعته

[3]- cagA pathogenicity island

در طی دو ماه گذشته نسبت آلبومین به کراتینین ۳۰۰-۳۰ به دست آید (۱۵).

تست ایمونولوژی جهت اثبات وجود پادتن‌های ضدهلیکوباکتر پیلوری

سرم بیماران جهت انجام آزمایش‌های ایمونولوژی پادتن‌های ضد *هلیکوباکترپیلوری* از نوع IgG و IgM به روش الایزا و با استفاده از کیت شرکت مونوبایند ساخت کشور امریکا موردبررسی قرار گرفت. کلیه افراد موردمطالعه (بارضایت شخصی)، جهت انجام اندوسکوپی به متخصص گوارش ارجاع داده شدند.

جداسازی و شناسایی *هلیکوباکتر پیلوری* از بیوپسی افراد دیابتی

نمونه بیوپسی از ناحیه آنتروم معده ۷۶ نفر بیمار موردمطالعه، توسط پزشک متخصص گرفته شد (لازم به ذکر است از هر بیمار دو نمونه گرفته شد). یک نمونه جهت بررسی وضعیت اوره آزی سریع بلافاصله بعد از گرفتن نمونه در اتاق اندوسکوپی استفاده و یک نمونه جهت تهیه بلوک پاتولوژی در فرمالین ۱۰٪ نگهداری شد (۱۶).

ارزیابی نمونه‌های بیوپسی جهت وجود آنزیم اوره آز

آزمایش اوره آز روش بسیار ساده‌ای است که به‌راحتی در آزمایشگاه انجام می‌گردد و در تشخیص *هلیکوباکترپیلوری* بسیار مؤثر است. از فواید این تست این‌که برای انجام آن نیازی به رشد باکتری نیست. آنزیم اوره آز باکتری، اوره‌ی موجود در محیط را هیدرولیز کرده و درنتیجه تولید آمونیاک می‌نماید که باعث افزایش pH و تغییر رنگ از زرد به قرمز می‌گردد (این تغییر رنگ بعد از حداقل ۳۰ دقیقه تا حداکثر ۲ ساعت قابل‌رؤیت است) (۱۴).

ارزیابی پاتولوژی بیوپسی معده بیماران دیابتی

یک قطعه از بافت معده در لوله‌ی درپوش‌دار حاوی فرمالین ۱۰٪ به آزمایشگاه پاتولوژی انتقال داده شد. پس از تهیه‌ی بلوک و سفت شدن قالب‌ها، با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی از نمونه‌ها تهیه گردید. برش‌ها جهت رنگ‌آمیزی هماتوکسینائوزین بر روی لام قرار گرفتند و سپس با استفاده از رنگ‌های عنوان‌شده، رنگ‌آمیزی و در انتها با استفاده از میکروسکپ مورد مطالعه‌ی پاتولوژی قرار گرفتند.

ارزیابی مولکولی بیوپسی بیماران جهت حضور ژن‌های *ureC* و *cagA* هلیکوباکتر پیلوری

جهت بررسی و شناسایی مولکولی جدایه‌های *هلیکوباکترپیلوری* ژن‌های *ureC* و *cagA* موردمطالعه قرار گرفتند. این قطعات ژنتیکی با استفاده از پرایمر اختصاصی، تکثیر و جدایه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* شناسایی و تائید شدند و میزان شیوع آن در بیماران دیابتی تعیین گردید.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه‌های بیوپسی، ابتدا پارافین زدایی انجام شد. سپس با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA (شرکت تکاپو زیست)؛DNAی بافت‌ها استخراج گردید.

تشخیص مولکولی

جهت بررسی ژن *ureC* در جدایه‌های *هلیکوباکترپیلوری*، DNA استخراج شده این نمونه‌ها با شناسایی باند ۲۹۴ جفت بازی ژن *ureC* با استفاده از پرایمرهای AAG CTT TTA GGG F: 5′-GTG TTA GGG GTT T-3′ و AAG CTT ACT TTC R: 5′-TAA CAC TAA CGC-3′ مورد تکثیر ژنومی قرار گرفتند. PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت بیورد آلمان؛ با شرایط ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (Hotstart) و در ادامه ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (Denaturation)، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (Annealing)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (Extension) و در پایان ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (FinalExtension) انجام گردید. برای این منظور، تکثیر DNAی هدف، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر DNAی الگو، بافر PCR با غلظت 10X ۲/۵ میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر، dNTP، $Mgcl_2$ ۰/۷ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها و ۰/۳ میکرولیتر DNA پلی مراز (Taq) انجام گردید. همچنین یک کنترل مثبت شامل اجزاء واکنش تکثیر ژنومی به همراه DNAی *هلیکوباکترپیلوری* (سویه *هلیکوباکترپیلوری* ATCC26695) به‌عنوان نماینده *هلیکوباکتر پیلوری* استفاده گردید. همچنین جهت بررسی ژن *cagA* در جدایه‌های *هلیکوباکتر پیلوری*، تائید DNA استخراج‌شده این نمونه‌ها با شناسایی باند ۳۲۰ جفت بازی ژن *cagA* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی F: 5′- GTTGAT AAC GCT GTC GCT TC-3′ و R: 5′-GGG TTG TAT GAT ATT TTC CAT AA-3′ انجام گرفت. PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر با شرایط ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (Hotstart) و در ادامه ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (Denaturation)،

۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (Annealing)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (Extension) و در پایان ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (FinalExtension) انجام گردید. برای این منظور، تکثیر DNAی هدف، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر DNAی الگو، بافر PCR با غلظت 10X ۲/۵ میکرولیتر، ۰/۷ میکرولیتر، dNTP، $Mgcl_2$ ۰/۸ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها و ۰/۲ میکرولیتر DNA پلی مراز (Taq) انجام گردید. از سویه‌ی استاندارد *هلیکوباکتر پیلوری (ATCC26695)* به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵٪ بررسی گردید (۱۸).

آنالیز آماری

از نرم‌افزار spss نسخه ۱۹ و آزمون‌های آماری مربع کای و فیشر جهت تجزیه‌وتحلیل نتایج استفاده گردید $P< ۰/۰۵$ به‌عنوان درجه‌ی معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌های قندخون ناشتای (FBS) ۷۶ فرد موردمطالعه؛ مشخص شد که بیشترین و کمترین فراوانی قند خون در افراد مورد آزمون، به ترتیب، مربوط به دامنه ۱۰۰-۳۰۰mg/dl، ۷۳ نفر (۹۶٪) و ۳۰۰mg/dl<، ۳ نفر (۴٪) بود. طی انجام آزمایش قند خون دو ساعت بعد از ناشتا (2hpp) که از افراد به عمل آمد، دامنه قند خون ۱۵۰-۳۵۰mg/dl، ۶۹ نفر (۹۰/۸٪) دارای بیشترین فراوانی و دامنه ۳۵۰mg/dl<، ۷ نفر (۹/۲٪) دارای کمترین فراوانی بودند.

همچنین جهت بررسی قند خون افراد طی سه ماه گذشته، آزمایش هموگلوبین گلیکوزیله (Hb A1C) انجام شد که مشخص گردید در افراد مورد آزمون دامنه ۱۰٪-۶٪ دارای بیشترین فراوانی ۴۸ نفر (۶۳/۱۶٪) بودند و کمترین فراوانی متعلق به دامنه ۱۰٪< ۱۶ نفر (۲۱٪) بود و بقیه افراد هموگلوبین گلیکوزیله زیر ۶٪ داشتند.

به‌منظور بررسی افراد ازنظر ابتلا به میکروآلبومینوری، از تمامی افراد موردمطالعه، دو نمونه ادرار ۲۴ ساعته طی دو ماه گرفته و نسبت آلبومین به کراتینین ادرار افراد سنجیده شد. نسبت آلبومین به کراتینین در ۵۲ (۶۸/۴۲٪) نمونه بین ۳۰۰-۳۰ به دست آمد که نشان‌دهنده‌ی وجود بیماری میکروآلبومینوری در این افراد بود و در ۲۴ (۳۱/۵۸٪) نمونه، این نسبت کمتر از ۳۰ به دست آمد که نشان‌دهنده‌ی عدم وجود میکروآلبومینوری در این افراد است.

جدول ۱ رابطه‌ی بین جنس و میکروآلبومینوری را نشان می‌دهد. نتایج بیانگر آن بود که در جمعیت موردمطالعه، بین جنس و میکروآلبومینوری ازنظر آماری رابطه‌ی معنی‌دار وجود داشت $P<۰/۰۵$.

جدول ۱. رابطه‌ی بین جنس و میکروآلبومینوری

میکروآلبومینوری	مردان تعداد (٪)	زنان تعداد (٪)
منفی	۱۱ (۲۲/۹)	۱۱ (۳۹/۳)
مثبت	۳۷ (۷۷/۱)	۱۷ (۶۰/۷)
جمع	۴۸ (۱۰۰)	۲۸ (۱۰۰)

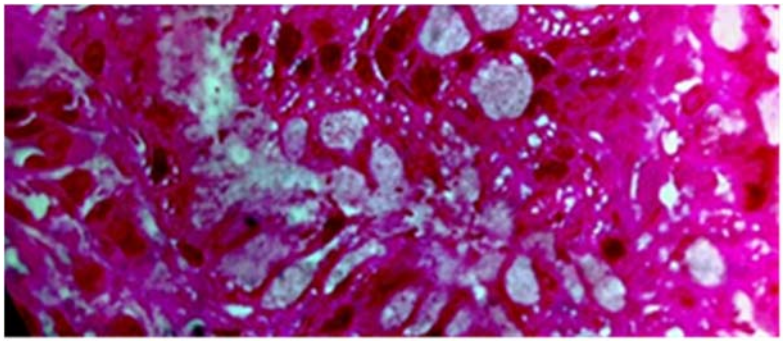
از ۷۶ فرد موردمطالعه، آزمایش‌های ایمونولوژی پادتن‌های ضد *هلیکوباکتر پیلوری* از نوع IgG و IgM به عمل آمد که ۲۸ (۳۶/۸۴٪) نفر دارای پادتن ضد *هلیکوباکترپیلوری* از نوع IgGای بالا (بیشتر از ۲۰) و پادتن ضد *هلیکوباکترپیلوری* از نوع IgM نرمال (کمتر از ۴۰) بودند که وجود باکتری *هلیکوباکترپیلوری* را نشان داد و بقیه افراد (۴۸ نفر، ۶۳/۱۶٪) همگی دارای پادتن ضد *هلیکوباکترپیلوری* از نوع IgG و IgM نرمال بودند.

نتیجه‌ی حاصل از تست اوره آز سریع بیوپسی ۷۶ فرد موردمطالعه نشان داد که ۲۸ نمونه (۳۶/۸۴٪) اوره آز مثبت و ۴۸ (۶۳/۱۶٪) نمونه اوره آز منفی می‌باشند.

پس از تهیه لام از بافت بیوپسی و رنگ‌آمیزی هماتوکسینائوزین، باکتری *هلیکوباکترپیلوری* به‌صورت استوانه‌های کوچک تیره‌رنگ در سطح اپیتلیوم و درون غدد مخاطی در لام‌های *هلیکوباکتر پیلوری* مثبت، دیده شد (شکل ۱).

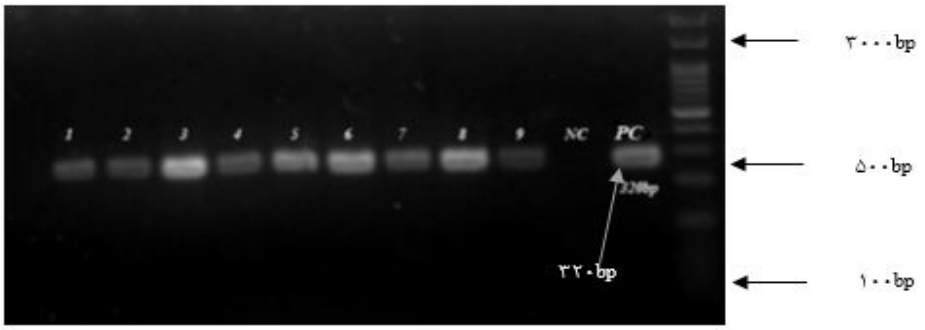
میزان شیوع *هلیکوباکترپیلوری* با روش PCR و پرایمرهای *ureC* در نمونه‌ی بیوپسی بیماران مبتلا به دیابت نوع دو که در این مطالعه شرکت نمودند ۳۶/۸۴٪ به دست آمد (شکل ۲). میزان شیوع ژن *cagA* در نمونه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* مثبت ۲۸/۵۷٪ بود (شکل ۳).

در این مطالعه ۷۶ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو بررسی شدند



شکل ۱. تصویر *هلیکوباکتر پیلوری* در زیر میکروسکپ با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسین- ائوزین
در این تصویر *هلیکوباکتر پیلوری* به‌صورت استوانه‌های کوچک تیره‌رنگ در سطح اپیتلیوم و درون غدد مخاطی دیده شد.

شکل ۲. ژل الکتروفورز، آشکارسازی ژن *ureC* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪
در این تصویر نمونه ۲ فاقد ژن ureC، نمونه ۸ کنترل مثبت (سویه *هلیکوباکتر پیلوری ATCC26695*) (قطعه‌ی ۲۹۴ جفت بازی)، نمونه ۹ کنترل منفی و مابقی نمونه‌ها ژن *ureC* را دارا می‌باشند.



شکل ۳. ژل الکتروفورز، آشکارسازی ژن *cagA* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪
در این تصویر، نمونه PC کنترل مثبت (سویه *هلیکوباکتر پیلوری ATCC26695*) (قطعه‌ی ۳۲۰ جفت بازی)، نمونه NC کنترل منفی و مابقی نمونه‌ها ژن *cagA* را دارا می‌باشند.

که ۵۲ نفر (۶۸/۴۲٪) از آن‌ها مبتلا به میکروآلبومینوری و ۲۴ نفر (۳۱/۵۸٪) بدون میکروآلبومینوری بودند. از کل نمونه‌ها ۲۸ نفر (۳۶/۸۴٪) دارای عفونت *هلیکوباکترپیلوری* بودند که۲۱ نفر (۴۰/۳۸٪) آنان مبتلا به میکروآلبومینوری بودند و از بین ۲۸ نمونه‌ی *هلیکوباکترپیلوری* مثبت، ۸ نمونه (۲۸/۵۷٪) دارای ژن *cagA* بودند که ۷ نفر (۲۵٪) از گروه افراد مبتلا به دیابت نوع

دوی مبتلا به میکروآلبومینوری و ۱ نفر (٪۳/۵۶) از گروه افراد مبتلا به دیابت نوع دوی بدون میکروآلبومینوری بودند. طبق نتایج به‌دست‌آمده در جمعیت موردمطالعه و با روش اتخاذشده، با وجود اینکه میکروآلبومینوری در افراد دارای عفونت *هلیکوباکترپیلوری*، بیشتر از افرادی بود که این عفونت را نداشتند، اما ازنظر آماری ارتباط معنی‌داری بین میکروآلبومینوری و عفونت *هلیکوباکترپیلوری* به دست نیامد (P> ۰/۰۵).

نتایج نشان داد که بروز میکروآلبومینوری در افراد *cagA+* بیشتر از افراد *cagA-* است (جدول ۲) ولی ازنظر آماری رابطه بین میکروآلبومینوری و *cagA* معنی‌دار نبود (P> ۰/۰۵).

جدول۲. بررسی میکروآلبومینوری در افراد cagA+ و-cagA

میکروآلبومینوری	*cagA+*	*cagA-*
منفی	۱(٪۱۲/۵)	۵ (٪۲۵/۰)
مثبت	۷(٪۸۷/۵)	۱۵ (٪۷۵/۰)
جمع	۸ (٪۱۰۰)	۲۰(٪۱۰۰)

بحث و نتیجه گیری

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٪ از موارد نارسایی کلیه را تشکیل می‌دهد. این بیماری با دفع پروتئین از ادرار، فشارخون بالا و نارسایی پیشرفته‌ی کلیه مشخص می‌شود (۲۰-۱۹). نفروپاتی دیابتی مراحل مختلفی را طی می‌کند که به ترتیب شامل افزایش فیلتراسیون گلومرولی، میکروآلبومینوری، ماکروپروتئینوری و نارسایی پیشرفته‌ی کلیه است (۲۰).

میکروآلبومینوری مرحله‌ای از مشکلات کلیوی دیابت است که مدت‌ها قبل از بروز نفروپاتی بالینی به وقوع می‌پیوندد و پیش‌بینی کننده‌ی نارسایی کلیه در آینده است. درواقع 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 (۱، ۴).

برخی مطالعات نشان می‌دهند که عفونت با *هلیکوباکترپیلوری* می‌تواند سبب افزایش تولید سایتوکاین‌هایی نظیر IL-1,TNFα, VPGF شود. این سایتوکاین‌های التهابی می‌توانند باعث تغییر نفوذپذیری غشای گلومرولی و خروج آلبومین و ایمنوگلوبین‌ها در ادرار گردند. در حقیقت این سایتوکاین‌های التهابی گلومرونفریت و پروتئینوری را القا کنند (۱۱).

هلیکوباکترپیلوری شایع‌ترین باکتری است که جوامع انسانی را در بعد جهانی مبتلا به عفونت ساخته است. شیوع این باکتری در ایران ۹۲-۸۲٪ گزارش شده است (۲۱). در خصوص شیوع *هلیکوباکترپیلوری* در افراد مبتلا و غیر مبتلا به دیابت نوع دو در دیابتی‌های جامعه، گزارش‌های متفاوتی وجود دارد. در مطالعه‌ای در ترکیه که توسط دمیر و همکاران وی صورت گرفت، تفاوت بین افراد مبتلا و غیر مبتلا به دیابت ازنظر عفونت *هلیکوباکترپیلوری* معنی‌دار به دست نیامد (۲۲). یافته‌ی جالب‌توجه در 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 ازنظر عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* در جمعیت موردمطالعه در ایتالیا که توسط کوآدری و همکاران انجام شد، معنی‌دار گزارش‌شده ولی در مورد مردان، اختلافی مشاهده نشده است (۲۳). نتایج این مطالعه مؤید اهمیت جنسیت در میزان ابتلا به عفونت *هلیکوباکترپیلوری* است. در مطالعه‌ی ما شیوع بالاتری ازنظر عفونت *هلیکوباکترپیلوری* در مردان به دست آمد که نتایج بامطالعه‌ای که در ترکیه انجام‌شده بود یکسان نیست.

در مطالعه‌ای جدیدتر که توسط تانریوردی، در مورد ارتباط عفونت *هلیکوباکترپیلوری* 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 ازنظر آماری در مقایسه با بیماران مبتلا به دیابت نوع دو که آلوده به *هلیکوباکترپیلوری* نبودند؛ معنی‌دار به‌دست‌آمده است. با توجه به اینکه نشانگرهای التهابی در بیماران مبتلا به دیابت همراه با عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* به‌صورت معنی‌داری بالاتر بوده است،

چنین نتیجه‌گیری نمودند که *هلیکوباکتر پیلوری* چون باعث پاسخ التهابی سیستمیک می‌گردد، می‌تواند عاملی برای پیشرفت نفروپاتی دیابتی یا ایجاد آن قلمداد گردد (۲۴).

با توجه به مطالعه‌ای که عبدالهی و همکاران در اصفهان، بر روی ژنوتیپ‌های مختلف *هلیکوباکترپیلوری* در بیماران دچار دیابت نوع دوی مبتلا یا غیر مبتلا به میکروآلبومینوری انجام دادند، مشخص شد که ژنوتیپ *vacA* ارتباطی با میکروآلبومینوری ندارد (۲۵) ولی نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد احتمال ارتباط ژنوتیپ *cagA* با عارضه‌ی میکروآلبومینوری بسیار محتمل است و درصورتی‌که تعداد نمونه‌ها افزایش یابد، ممکن است در بیماران ما این ارتباط معنی‌دار به دست آید. همچنین در مطالعه‌ی ملاباشی و همکاران وی نتایج نشان داد که بروز میکروآلبومینوری در افراد *cagA* مثبت بیشتر از افراد *cagA* منفی است ولی ازنظر آماری رابطه‌ی معنی‌داری بین میکروآلبومینوری و *cagA* وجود نداشت که بامطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد. نتایج حاصل از مطالعه‌ی ملاباشی و همکاران وی نشان داد که هر ۳ نفر (۱۰۰٪) دیابتی نوع دوی مبتلا به میکروآلبومینوری، *cagA* مثبت هستند درحالی‌که در مطالعه‌ی حاضر ۸ نمونه (۲۸/۵۷٪) دارای ژن *cagA* بودند که ۷ نفر (۲۵٪) از گروه افراد مبتلا به دیابت نوع دوی مبتلا به میکروآلبومینوری و ۱ نفر (۳/۵۶٪) از گروه افراد مبتلا به دیابت نوع دوی بدون میکروآلبومینوری بودند (۱۵). این مسئله نشانگر این حقیقت است که عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* نه به‌صورت کلی، بلکه در رابطه با ژنوتیپ‌های خاصی از باکتری در بروز میکروآلبومینوری ایفای نقش می‌نماید. ارتباط معنی‌دار ژنوتیپ *cagA هلیکوباکترپیلوری* و میکروآلبومینوری در بعضی از مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (۱۱، ۱۴).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو دچار میکروآلبومینوری شیوع بالاتری داشت. همچنین اکثر نمونه‌های *cagA*+ از گروه بیماران مبتلا به میکروآلبومینوری بود. به نظر می‌رسد، انجام چنین مطالعه‌ای در حجم نمونه‌ی به‌مراتب بالاتر، لازم است و می‌تواند به جمع‌بندی قطعی‌تر یافته‌ها و کاربرد بالینی آن‌ها منجر گردد.

تشکر و قدردانی

از تمام کسانیکه این‌جانب را در نگارش و جمع‌آوری مطالب همواره موردحمایت و همراهی خود قرار دادند، کمال تشکر و قدردانی را دارم (کد طرح: ۱۵۲۳۰۵۰۷۹۲۲۰۱۹).

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

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 ClinMicrobiol. 1998; 36(5): 1271-6.
8. Ribeiro ML, Godoy AP, Benvengo YH, Mendonca S, PedrazzoliJJr. 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 cytotoxinassociated 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. ClinSci (Lond). 2005;109(2): 143-59.
13. Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. N Engl J Med. 2002; 347(15): 1175-86.
14. 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.
15. Mollabashi Z, Zolfaghari MR, Amini M, Salehi R. The relation of microalbuminuria and *Helicobacter pylori cagA* gene in patiens with type 2 diabetes. Journal of Isfahan Medical School. 2012;193(30):822-31.[In Persian]
16. Ghasemi Sh, Chehrei A, Sadeghi S, Ebrahimi A. Evalution of diagnostic value of dimsa staining and rapid urease test in *Helicobacter Pylori.* Journal of Iran University of Medical Sciences. 2000;20(7):122-7.[In Persian]
17. Monteiro L, Gras N, Vidal R, Cabrita J, Megraud F. Detection of *Helicobacter Pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. Journal of Microbiological Methods. 2001;45(2):89-94.
18. Mobaraki M, Roghanian R, Azarm T, ZarkeshEsfahani H, Daghaghzadeh H. Simulataneous detection of *cagA* gene and *vacA* alleles in *Helicobacter Pylori* isolated from patients with gastriointestinal inflammations using multiplex PCR. Journal of Biology of Iran. 2011;24(6):895-903.[In Persian]
19. Rashki Kemmak M, Gol A, Dabiri SH. Preventive Effects of Garlic Juice on Renal Damages Induced by DiabetsMelitus in Rats. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism.2009; 11(3): 331-9.
20. Talaei A, Jabari S, Bigdeli MH, Farahani H, Siavash M. Correlation of microalbuminuria and urinary copper in type two diabetic patients. Indian J EndocrinolMetab. 2011; 15(4): 316-9.
21. 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 BiolSci.2007; 10(8):1185-9.
22. 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. DigDisSci. 2008; 53(10): 2646-9.
23. Quadri R, Rossi C, Catalfamo E, Masoero G, Lombardo L, DellaMonica P, et al. Helicobacter pylori infection in type 2 diabetic patients.NutrMetabCardiovasc Dis. 2000; 10(5): 263-6.
24. Tanriverdi O. Association of Helicobacter pylori infection with microalbuminuria in type 2 diabetic patients. Turk J Gastroenterol.2011;22(6): 569-74.
25. 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.

Original Article

Determining the Relationship between CagA+ Helicobacter Pylori Infection and Microalbuminuria in Type2 Diabetic Rats

Ahrarifar M, BaseriSalehi M*

Department of Microbiology, College of Science, Islamic Azad University of Kazeroun, Kazeroun, Iran

Received: 04 Nov 2016 Accepted: 04 Jul 2017

Abstract

Background & Objectives: Microalbuminuria is a metabolic disease, which is related to the development of diabetic nephropathy. There are several reports indicating high frequency of the occurrence of Helicobacter pylori infection in diabetic patients. It means that probably, there is a relationship between cagA positive Helicobacter pylori and microalbuminuria in diabetic patients. Hence, the present study was conducted to investigate the relationship between cagA positive Helicobacter pylori infection and microalbuminuria in the patients with type 2 diabetes.

Material & Methods: Totally, 76 blood and urine samples were collected from patients with type 2 diabetes. The blood samples were used to assess Glycoside Hemoglobin, Fasting Blood Sugar, two-hour postprandial Glucose, Anti-HpIgG and Anti-HpIgM. Molecular method was carried out for identification and helicobacter pylori positive samples were tested for the detection of cagA gene. Finally, Chi-Square test and Fisher technique were applied to analyze the data.

Results: The results obtained from this study indicated that Helicobacter pylori was isolated from 28 patients (36.84%) from which, 21 patients (75%) were afflicted with microalbuminuria and 8 samples (25%) were cagA genes positive. The results indicated that there was no statistically significant difference between cagA gene of Helicobacter pylori and microalbuminuria in patients with type 2 diabetes.

Conclusion: the findings showed that there was no significant correlation between cagA gene positive Helicobacter pylori infection, and microalbuminuria in the patients with type 2 diabetes.

Key Words: Helicobacterpylori, CagA Gene, Microalbuminuria

***Corresponding Author: Majid Baseri Salehi,** Department of Microbiology, College of Science, Islamic Azad University of Kazeroun, Kazeroun, Iran.
Email: Majidbaseri@hotmail.com

Journal of Fasa University of Medical Sciences 7 (2018): 438-446