مطالعه شمارش افتراقی لکوسیت‌ها در سگ‌های ژرمن شپرد مبتلا به دیابت تجربی القاء شده با آلوکسان

محمدرضا ولیلو[1*]، علیرضا لطفی[2]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، گروه دامپزشکی، شبستر، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، باشگاه پژوهشگران جوان، شبستر، ایران
* *نویسنده مسئول مکاتبات: mr_valilu@yahoo.com*
(دریافت مقاله: ۹۰/۷/۲۳، پذیرش نهایی: ۹۰/۹۰/۳)

چکیده

عارضه دیابت اغلب عملکردهای فیزیولوژیکی شامل خون‌سازی و سیستم ایمنی بدن را درگیر می‌کند. در این پژوهش ده قلاده سگ ژرمن شپرد نر و هم سن انتخاب شده، ۵ قلاده به عنوان گروه شاهد و ۵ قلاده به عنوان گروه آزمایشی (قبل و بعد از القاء دیابت) تفکیک شد. آزمایش با رعایت اصول حقوق حیوانات انجام گرفت و قبل از شروع آزمایش از سلامت حیوانات و غیردیابتی بودن آنها (با استفاده از تست تحمل گلوکز) اطمینان حاصل شد. آلوکسان مونوهیدرات در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون وریدی تزریق شد. نمونه خون کامل قبل و بعد از القاء دیابت و قبل از اتلاف حیوان اخذ شده و از نظر تعداد لکوسیت‌ها (نوتروفیل، لمفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل و بازوفیل) شمارش شد. طبق یافته‌ها، تعداد ائوزینوفیل‌ها و بازوفیل‌ها در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نداشت. اما تعداد نوتروفیل، لمفوسیت و مونوسیت تفاوت معنی‌داری بعد از القاء دیابت داشت به طوری که تعداد نوتروفیل‌ها در سگ‌های دیابتی ۸۲/۳٪ (در مقایسه با ۷۲/۳۸٪ در گروه شاهد و ٦۹/۵۳٪ در زمان قبل از القای دیابت) بود. لمفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها در گروه دیابتی کمتر از گروه شاهد و زمان پیش-دیابت بود (لمفوسیت: ۲۲/۷۹، ۲٦/۲٤ و ۱٤/۵۹٪ و مونوسیت: ۲/۰۵، ۲/۵۸ و ۱/۸۱٪ به ترتیب برای گروه‌های شاهد، پیش- و پس-دیابتی). به نظر می‌رسد عامل کاهش تعداد لمفوسیت‌ها، اختلال در تکثیر و فعالیت آنها در گروه دیابتی بوده باشد. نتیجه می‌گیریم که القاء دیابت در سگ‌های ژرمن شپرد می‌تواند سبب کاهش تعداد مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها و افزایش تعداد نوتروفیل‌ها شود. احتمالاً اختلال در متابولیسم گلوکز و گلوتامین و نیاز بالای نوتروفیل‌ها به این منابع موجب تغییر و افزایش تعداد نوتروفیل‌ها در شرایط دیابتی شده باشد. به نظر می‌رسد مطالعات بیشتر در رابطه با دلایل احتمالی تغییر تعداد لکوسیت‌ها در سگ‌های دیابتی ضروری باشد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۹۰، دوره ۵، شماره ۲، پیاپی ۱۸، صفحات: ۱۲۲۰-۱۲۱۷.
کلید واژه‌ها: دیابت، هماتوپویز، لکوسیت، سگ‌های ژرمن شپرد

مقدمه

عارضه دیابت یکی از بیماری‌های سیستم درون ریز بدن است که صرف‌نظر از صدمات متابولیکی، سیستم قلبی- عروقی و گردش خون را نیز درگیر می‌کند. در حدود ٦/۳٪ جمعیت دنیا مبتلا به دیابت یا اصطلاحاً دیابتی هستند. از علائم وقوع دیابت می‌توان پلی اوری، افزایش اشتها، کاهش وزن، مشکلات

Archive of SID
www.SID.ir

قلبی- عروقی، نارسایی کلیه، شوک، کتوز، افزایش قند خون و فشار خون و ... را نام برد (۸).

بنکداران و همکاران (۱) آنمی را یکی از مشکلات عمده افراد دیابتی برشمرده‌اند. مطالعات منتشر شده نشانگر وجود ارتباط مثبت بین دیابت تیپ ۱ و ۲ و سطح پایین اریتروپویتین سرم است (۳ و ۱٦). مطالعات پیشنهاد می‌کنند علاوه بر اینکه در شرایط نفروپاتی دیابتیک آنمی بروز می‌کند، در برخی از موارد دیابتی بدون نفروپاتی نیز وقوع آنمی گزارش شده است (٤). در همین راستا پژوهشگران ایرانی (۱) طی بررسی اپیدمیولوژیک بر روی بیماران دیابتی پیشنهاد کردند که عارضه آنمی در بیماران دیابتی تیپ ۲ بدون بروز عوارض کلیوی می‌تواند رخ دهد، شدت آنمی با شدت دیابت مرتبط بوده و در موارد نفروپاتی دیابتی، عارضه آنمی نیز با شدت بالایی بروز می‌کند.

آلوکسان ماده‌ای است که در مطالعات برای القاء دیابت در مدل‌های آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. آلوکسان یک عامل اکسیدکننده قوی بوده و اسید دیالوریک متابولیت حاصل از واکنش کاهشی است. آلوکسان و اسید دیالوریک ترکیبی به نام "آلوکسانتین" را تشکیل می‌دهند که یک ترکیب دیابتوژنیک قوی می‌باشد (۹).

صدمات پاتولوژیک دیابت تجربی القاء شده با آلوکسان در مدل سگ در کلیه‌ها (۱۳ و ۱۵)، بیضه‌ها (۱۱)، شریان‌ها (۱۲)، کبد (۱۵) گزارش شده است. در مطالعه اخیر (۱۰)، مشاهده نمودیم که دیابت القاء شده با آلوکسان تأثیر معنی‌داری بر فعالیت اریتروپویز (تعداد گویچه‌های قرمز، نرخ هماتوکریت، غلظت هموگلوبین و ..) سگ های ژرمن شپیرد دیابتی نداشت. با توجه به یافته‌های اخیر (۱۰) و پیشنهاد بنکداران و همکاران (۱) هدف از این مطالعه بررسی اثرات دیابت تجربی القاء شده با آلوکسان بر تعداد گلبول‌های سفید خون در سگ‌های ژرمن شپیرد (به عنوان مدل آزمایشگاهی دیابتی) است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۱۰ قلاده سگ نر نژاد ژرمن شپیرد شپیرد در سنین ۲-۱/۵ سال انتخاب مورد آزمایش قرار گرفتند. پیش از شروع آزمایش حیوانات معاینه شدند و از نظر سلامتی و عدم وجود عارضه متابولیکی و بیماری خاص اطمینان حاصل شد. سگ‌ها به اتاق حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر منتقل و شماره‌گذاری شدند. حیوانات تحت درمان انگلی (تزریق لوامیسول) و تزریق واکسن هاری قرار گرفتند. حیوانات در داخل باکس‌ها (با رعایت حقوق حیوانات) و با دسترسی آزاد به آب و سه وعده غذایی قرار داده شدند. گروه‌های آزمایشی شامل گروه شاهد (بدون القاء دیابت) و گروه آزمایشی (پیش از القاء و پس از القاء دیابت) و هر یک شامل ۵ قلاده بودند. برای عادت پذیری حیوانات به شرایط محیطی و جلوگیری از بروز تنش، القاء دیابت بعد از یک هفته انجام گرفت. بعد از زمان آدابتاسیون، برای اطمینان از عدم وجود دیابت، تست وریدی تحمل گلوکز (IVGTT) صورت گرفت. بعد از ۵ روز، به حیوانات گروه دوم، آلوکسان (ساخت سیگما- آلدریچ، ایالات متحده) در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل وریدی تزریق شد. یک هفته بعد، دومین IVGTT انجام گرفت و بروز عارضه دیابت تایید شد. در طول مطالعه، معاینات بالینی (شامل اخذ دمای رکتال، ضربان قلب، نرخ تنفس و ...) برای حیوانات هر دو گروه انجام می‌گرفت.

نمونه کامل خون از سگ‌های گروه شاهد و گروه دیابتی (قبل و بعد از القاء دیابت) اخذ شده و در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) برای شمارش تفریقی لکوسیت‌ها (شامل نوتروفیل، لمفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل و بازوفیل‌ها) با تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی به آزمایشگاه منتقل شد. اخذ نمونه خون از گروه دیابتی در زمان بروز دیابت حاد انجام گرفت. در این مطالعه هیچ‌گونه درمان و تجویز دارو برای حیوانات دیابتی انجام نگرفت.

Archive of SID

آنالیز آماری داده‌ها

داده‌های حاصل از آزمایش خون با استفاده از نرم افزار SAS دامنه‌ای داده‌های حاصل از گروه‌های آزمایشی مورد مقایسه میانگین قرار گرفتند ($p<$۰/۰۱ و n:5).

یافته‌ها

مطابق نتایج حاصل جدول ۱ تعداد ائوزینوفیل‌ها و بازوفیل‌ها بین گروه‌های آزمایشی (قبل و بعد از القای دیابت) تفاوت معنی‌داری نداشتند. تعداد نوتروفیل‌ها، لمفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها تغییر معنی‌داری بعد از القای دیابت نشان دادند به طوری که نوتروفیل‌ها در گروه دیابتی به ۸۲/۳٪ افزایش یافت (در مقایسه با ۷۲/۳۸٪ در گروه شاهد و ٦۹/۵۳٪ در شرایط پیش از القای دیابت) و لمفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها کاهش معنی‌داری در گروه دیابتی در مقایسه با گروه شاهد و قبل از القای دیابت داشتند (لمفوسیت‌ها: ۲۲/۷۹٪، ۲٦/۲٤٪ و ۱٤/۵۹٪، مونوسیت‌ها: ۲/۰۵٪، ۲/۵۸٪ و ۱/۸۱٪ به ترتیب برای گروه‌های شاهد، پیش و پس از القای دیابت).

جدول۱- شمارش افتراقی لکوسیت‌ها شامل نوتروفیل، لمفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل و بازوفیل‌ها در سگ‌های ژرمن شپرد گروه شاهد، پیش و پس از القای دیابت تجربی

لکوسیت‌ها (درصد از کل)	گروه شاهد (غیردیابتی)	قبل از تزریق آلوکسان (غیردیابتی)	بعد از تزریق آلوکسان (دیابتی)	ارزش p	SEM
نوتروفیل	۷۲/۳۸^{b}	٦۹/۵۳^{c}	۸۲/ ۱۳ ^{a}	** <۰/۰۰۰۱	۰/۸٤۲
لمفوسیت	۲۲/۷۹ ^{b}	۲٦/۲٤^{a}	۱٤/۵۹ ^{c}	** <۰/۰۰۰۱	۰/٦۵۹
مونوسیت	۲/۰۵^{b}	۲/۵۸^{a}	۱/۸۱ ^{b}	** ۰/۰۰٤٦	۰/۱۳۰
ائوزینوفیل	۲/۵۹	۲/۳۱	۱/٤٦	*ns* ۰/۰۵۹	۰/۲۹۵
بازوفیل	۰/۱۱	۰/۰٤	۰/۰۱	*ns* ۰/۲۵۸	۰/۰۳۷

**: اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪، ns: اختلاف غیرمعنی‌دار

بحث و نتیجه‌گیری

Vozarova و همکاران (۱٤) طی بررسی‌هایی که بر روی تحمل گلوکزی، ویژگی‌های آزادسازی انسولین و تعداد لکوسیت‌های ۳۵۲ الگوی غیردیابتی داشتند پیشنهاد کردند که نرخ بالای تعداد لکوسیت‌ها می‌تواند پیشگوی وقوع عارضه دیابت بوده و احتمالاً نشانه‌ای از اختلال در فعالیت انسولین و توسعه دیابت تیپ ۲ باشد. Gkrania-Klotsas و همکاران (٦) نیز پیشنهاد کردند که تعداد لکوسیت‌ها به ویژه لمفوسیت (و نه مونوسیت) دارای همبستگی مثبت با ریسک وقوع دیابت تیپ ۲ است. در مطالعه آنها الگوهای بررسی شده از نظر سن، جنسیت، مصرف دخانیات و شاخص جرم بدنی تصحیح شده بودند. Azeez و همکاران (۲) گزارش کردند که تعداد لمفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها بعد از القای دیابت (تا زمان اتلاف حیوانات دیابتی) تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشته‌اند. همچنین در مطالعه Erkin و همکاران (۵) نیز کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد لکوسیت‌های بیماران مبتلا به رتینوپاتی دیابتی در مقایسه با الگوهای سالم (شاهد) نداشتند. اما در مطالعه حاضر این دو فراسنجه (لمفوسیت و نوتروفیل) تغییر معنی‌داری را در گروه دیابتی داشتند، در حالی که ائوزینوفیل‌ها و بازوفیل‌ها اختلاف معنی‌داری (در مقایسه با گروه شاهد و قبل از القای دیابت) نداشتند (جدول ۱). یافته‌های مطالعه حاضر (افزایش معنی‌دار تعداد نوتروفیل‌ها و کاهش تعداد مونوسیت‌ها) با یافته‌های Vozarova و همکاران (۱٤)، Gkrania-Klotsas و همکاران (٦) همخوانی داشته ولی مخالف یافته‌های Azeez و همکاران (۲) می‌باشند. از طرفی، بروز افزایش در تعداد نوتروفیل‌ها و کاهش در تعداد مونوسیت‌ها (در نتیجه افزایش نسبت نوتروفیل به مونوسیت) به مفهوم یک زیست-نشانگر مهم برای شرایط تحریک ایمنی بدن (مانند شرایط بروز التهاب) مورد قبول قرار گرفته است (٦ و ۷). به نظر می‌رسد فعالیت نسبی سیستم ایمنی در مطالعه حاضر پیرو القای دیابت، ناشی از

Archive of SID

www.SID.ir

آسیب‌زا (پاتوژنز) بودن عارضه دیابت باشد که در مطالعه Vozarova و همکاران (۱٤) نیز مشاهده شده است.

از یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که القای دیابت در سگ‌های ژرمن شیپرد می‌تواند موجب کاهش مونوسیت و لنفوسیت و افزایش تعداد نوتروفیل‌ها باشد. چنان‌که در مطالعه بنکداران و همکاران (۱) در الگوهای دیابتی نیز پیشنهاد شده است، اختلال در متابولیسم گلوکز و گلوتامین به عنوان مواد مغذی لازم برای تکثیر این دسته از لکوسیت‌ها ممکن است باعث افزایش نوتروفیل‌ها در سگ‌های دیابتی شده باشد. انجام مطالعات بیشتر در راستای مشخص شدن دلایل و مکانیسم‌های تغییر تعداد لکوسیت‌ها در الگوهای دیابتی ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

۱. بنکداران، ش.، قره باغی، م. و واحدیان، م. ۱۳۸۸. کم‌خونی در بیماران دیابتی نوع ۲ و رابطه آن با درجه‌های مختلف درگیری کلیوی. مجله غدد درون ریز و متابولیسم ایران، دوره یازدهم، شماره ۲، صفحات: ۱۳٤-۱۲۷.

2. Azeez OI, Oyagbemi AA, Oyeyemi MO, Odetola AA 2010. Ameliorative effects of Cnidoscolus aconitifolius on alloxan toxicity in Wistar rats. African Health Sci., 10 (3): 283- 291.
3. Bosman DR, Winkler AS, Marsden JT, Macdougall IC, Watkins PJ. 2001. Anemia with erythropoietin deficiency occurs early in diabetic nephropathy. Diabet. Care, 24:495-9.
4. Deray G, Heurtier A, Grimaldi A. 2004. Anemia and diabetes. Am. J. Nephrol., 24: 522-526.
5. Erkin EF, Guler C, Kayikcioglu O, Pirildar T, Ozdemir E. 2001. Diabetik retinopati ile hematolojik parametrelerin iliskisi. Ret-Vit., 9: 45-49. [in Turkish]
6. Gkrania-Klotsas E, Ye Z, Cooper AJ, Sharp SJ, Luben R, Biggs ML. 2010. Differential white blood cell count and type2 diabetes: systematic review and meta-analysis of cross-sectional and prospective studies. Plos One, 18: e13405.
7. Kučer, N., Matijatko, V., Kiš, I., Grden, D., Brkljačić, M., Foršek J., Žvorc Z., Rafaj RB. 2008. White blood cell count and neutrophil to lymphocyte ratio in uncomplicated and complicated canine babesiosis caused by Babesia canis canis. Vet. Arhiv., 78: 321-330.
8. Nelson, RW. 1995. Diabetes mellitus .In Text book of veterinary internal Medicine. Diseases of the dog and cat، 4th ed. edited by SJ. Ettinger and E. C. Feldman. Philadelphia، PA ، W. B. Saunders Co. P: 1510.
9. Santilli F, Cipollone F, Mezzetti A, Chiarelli F. 2004. The role of nitric oxide in the development of diabetic angiopathy. Hormone. Metabol. Res., 36: 319- 335.
10. Valilou M, Shayegh J, Eshratkhah B, Lotfi, AR. 2011. Hematopoietic measures in german shepherd dogs following Alloxan induced diabetes mellitus. Adv. Environ. Biol., 5: 1177-1180.
11. Valilou MR, Lotfi AR. 2010a. Investigation of Ultra structural changes in testicles of German shepherd dogs following alloxan induced diabetes mellitus. Global Veterinaria, 4 (1): 86-89.
12. Valilou MR, Lotfi AR 2010b. Investigation of ultrastructural and histopathological changes in coronary arteries of German shepherd dogs following Alloxan induced diabetes mellitus. African J. Biotechnol., 9 (41): 6932-6936.
13. Valilou MR, Sohrabi HR, Mohammadnejad D, Soleimani RJ. 2007. histopathological and ultra-structural lesions study of kidney of Alloxan induced diabetes mellitus in German shepherd dogs. J. Anim. Vet. Adv., 6 (8): 1012-1016.
14. Vozarova B, Weyer C, Lindsay RS, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. 2002. High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. Diabetes, 51: 455-461.
15. Watanabe, D., Nakara H, Yamaguchi Y, Akagi K, Hoshiya T, Nagashima Y, Okaniwa A, Yoshikawa H 2004. The Pathological Features of Alloxan Diabetes in Beagle Dogs. J. Toxicol. Pathol., 17 (3):187- 195.
16. Winkler, AS., Marsden, J., Chaudhuri, KR., Hambley,, H., Watkins, PJ. 1999. Erythropoietin depletion and anemia in diabetes mellitus. Diabet. Med., 16: 813-819.

Archive of SID

www.SID.ir