

مطالعه شمارش افتراقی لکوسیت‌ها در سگ‌های ژرمن شیپرد مبتلا به دیابت تجربی

القاء شده با آلوکسان

محمدرضا ولیلو^{۱*}، علیرضا لطفی^۲

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: ۹۰/۹/۳)

چکیده

عارضه دیابت اغلب عملکردهای فیزیولوژیکی شامل خون‌سازی و سیستم ایمنی بدن را درگیر می‌کند. در این پژوهش ده قلاده سگ ژرمن شیپرد 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 مونویدرات 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 ۶۹/۵۳٪ 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، ۲۶/۲۴ و ۱۴/۵۹٪ 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 شیپرد 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، دوره ۵، شماره ۲، پیاپی ۱۸، صفحات: ۱۲۲۰-۱۲۱۷.

کلید واژه‌ها: دیابت، هماتوپوئیز، لکوسیت، سگ‌های ژرمن شیپرد

مقدمه

دنیا مبتلا به دیابت یا اصطلاحاً دیابتی هستند. از علائم وقوع دیابت می‌توان پلی‌اور، افزایش اشتها، کاهش وزن، مشکلات

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 ۶/۳٪ جمعیت

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۱۰ قلابه سگ نر نژاد ژرمن شیپرد شیپرد 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 قلابه 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-آلدريج، 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.

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 برشمردند. مطالعات منتشر شده نشانگر وجود ارتباط مثبت بین دیابت تیپ ۱ و ۲ و سطح پایین اریتروپوئین سرم است (۳ و ۱۶). 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 (۴). 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 اریتروپوئین (تعداد گویچه‌های قرمز، نرخ هماتوکریت، غلظت هموگلوبین و ..) سگ‌های ژرمن شیپرد 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 شیپرد (به عنوان مدل آزمایشگاهی دیابتی) است.

آنالیز آماری داده‌ها

بحث و نتیجه‌گیری

داده‌های حاصل از آزمایش خون با استفاده از نرم افزار SAS دامنه‌ای داده‌های حاصل از گروه‌های آزمایشی مورد مقایسه میانگین قرار گرفتند ($p < 0.01$ 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 $82/3\%$ افزایش یافت (در مقایسه با $72/38\%$ در گروه شاهد و $69/53\%$ 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: $22/79\%$ ، $26/24\%$ و $14/59\%$ ، مونوسیت‌ها: $2/05\%$ ، $2/58\%$ و $1/81\%$ به ترتیب برای گروه‌های شاهد، پیش و پس از القای دیابت).

Voazarova و همکاران (۱۴) طی بررسی‌هایی که بر روی تحمل گلوکز، 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 (۶) 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 Voazarova و همکاران (۱۴)، Gkrania-Klotsas و همکاران (۶) 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 (۶ و ۷). به نظر می‌رسد فعالیت نسبی سیستم ایمنی در مطالعه حاضر پیرو القای دیابت، ناشی از

جدول ۱- 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	$72/38^b$	$69/53^c$	$82/13^a$	** <0.0001	0.842
لمفوسیت	$22/79^b$	$26/24^a$	$14/59^c$	** <0.0001	0.659
مونوسیت	$2/05^b$	$2/58^a$	$1/81^b$	** 0.0046	0.130
ائوزینوفیل	2/59	2/31	1/46	ns 0.059	0.295
بازوفیل	0/11	0/04	0/01	ns 0.258	0.037

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

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.

آسیب‌زا (پاتوژنز) بودن عارضه دیابت باشد که در مطالعه Vozarova و همکاران (۱۴) 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

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: ۱۳۴-۱۲۷.
2. Azeez OI, Oyagbemi AA, Oyeyemi MO, Odetola AA 2010. Ameliorative effects of *Cnidioscolus 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.

Differential leukocyte counts in German shepherd dogs following Alloxan-induced diabetes mellitus

Valilou, M.^{1*}, Lotfi, A.²

1-Department of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran

2-Young Researchers Club, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran

*Corresponding author's email: mr_valilu@yahoo.com

(Received: 2011/9/28, Accepted: 2011/11/24)

Abstract

Diabetes mellitus involves most physiological functions include hematopoiesis and immune system. In this research, ten male German shepherd dogs with same age were provided; five dogs were considered as control and five of them were considered as experimental groups; pre- and post- diabetes induction. The examinations were conducted to guarantee their health and absence of diabetes with Intra-venous glucose tolerance test (IVGTT) has been approved, according to Islamic Azad university animal ethics recommendations. Alloxan monohydrate with 100 mg/kg in was injected intravenously for experimental group. The blood samples were collected before and after diabetes induction (after 45 days). Next, leukocytes number includes neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil and basophil percents were measured. According to obtained results, eosinophil and basophil rates hadn't significant changes after diabetes induction. But neutrophil, lymphocyte and monocyte percents had significant changes after diabetes induction; while neutrophils were 82.3% in diabetic dogs (in comparison with 72.38% for control and 69.53% for pre-diabetes). Lymphocyte and monocyte counts were lower in diabetic dogs when they are compared with pre-diabetic and control measures (lymphocyte: 22.79, 26.24 and 14.59% and monocyte 2.05, 2.58 and 1.81% respectively for control, pre- and post-diabetes groups. It is seem that diabetes-related lymphocytes dysfunction may caused considerable lymphocytes rise in diabetic dogs in comparison with control or pre-diabetes groups. It was concluded that diabetes induction in German shepherd dogs may caused lymphocyte and monocyte numbers and neutrophils rises. It is suggested that impaired glucose and glutamine metabolism in diabetic condition and high demands of neutrophils for these substances may cause neutrophils rises in diabetic dogs. It seems that further studies about possible reasons of leukocytes number changes in diabetic dogs are necessary.

Keywords: Diabetes mellitus, Hematopoiesis, Leukocytes, German shepherd dogs