مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی نوزدهم، شماره‌ی ۵، صفحه‌های ۳۴۸ ـ ۳۴۰ (آذر ـ دی ۱۳۹۶)

مقاله‌ی پژوهشی

اثر تجویز خوراکی نیترات سدیم بر شمارش سلول‌های خونی در موش‌های صحرایی نر چاق و مبتلا به دیابت نوع ۲

وجیهه خراسانی[۱]، پریچهر یغمایی[۱]، دکتر مریم توحیدی[۳]، سودا غیبی[۲]، طرلان ورزندی[۲]، دکتر اصغر قاسمی[۲]

۱) دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران. ۲) مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد، پژوهشکده علوم و غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.۳) مرکز تحقیقات پیشگیری از بیماری‌های متابولیک، پژوهشکده علوم و غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول:** تهران، ولنجک، خیابان یمن، خیابان پروانه، مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد، پژوهشکده علوم و غدد درون‌ریز و متابولیسم، دکتر اصغر قاسمی؛ email: ghasemi@endocrine.ac.ir

چکیده

مقدمه: دیابت نوع ۲ یکی از شایع‌ترین بیماری‌های متابولیک است. نیترات به عنوان درمان جدیدی برای دیابت مطرح است. با توجه به اینکه هم دیابت و هم نیترات سدیم بر شمارش سلول‌های خونی اثر دارند و حدود ۳۰ درصد افراد دیابتی کم‌خونی دارند، این مطالعه با هدف بررسی اثر نیترات سدیم بر تعداد سلول‌های خونی در موش‌های صحرایی نر چاق دیابتی نوع ۲ انجام شد. مواد و روش‌ها: ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به چهار گروه کنترل، کنترل + نیترات، دیابت و دیابت+نیترات تقسیم شدند. هر یک از گروه‌هایی که نیترات دریافت می‌کردند به دو زیر گروه تقسیم شدند: کنترل + نیترات ۱۰۰ (CN 100) و کنترل+نیترات ۲۵۰ (CN250)؛ دیابت+نیترات ۱۰۰ (DN100) و دیابت نیترات ۲۵۰ (DN250). نیترات سدیم به مدت دو ماه در آب آشامیدنی در گروه‌های CN100، CN250، DN100، DN250 تجویز شد. دیابت با تجویز رژیم پرچرب به مدت ۱۴ روز و تزریق استرپتوزوتوسین القاء شد. شمارش سلول‌های خونی در پایان مطالعه انجام شد. یافته‌ها: تجویز نیترات به مدت دو ماه در موش‌های دیابتی موجب کاهش وزن، قند خون، هماتوکریت و نوتروفیل شد (p<۰/۰۵)، اما تعداد کل گلبول‌های سفید و لنفوسیت را افزایش داد (p<۰/۰۵). تجویز نیترات اثری بر تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، MCV، MCH، MCHC و تعداد پلاکت نداشت. نتیجه‌گیری: از این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که تجویز نیترات به عنوان یک عامل درمانی در موش‌های دیابتی مبتلا به دیابت نوع ۲ منجر به کاهش قند خون می‌شود و اثرات زیان‌بار عمده‌ای بر پارامترهای خونی ندارد و حتی با کاهش تعداد نوتروفیل‌ها ممکن است اثرات ضد التهابی داشته باشد.

واژگان کلیدی: دیابت نوع ۲، نیترات، شمارش سلول‌های خونی، موش صحرایی نر
دریافت مقاله: ۹۶/۵/۱۸ـ دریافت اصلاحیه:۹۶/۶/۱۹ ـ پذیرش مقاله: ۹۶/۶/۲۱

مقدمه

در حال حاضر، ٤١٥ میلیون نفر در جهان دیابت دارند که بیش از ۹۰ درصد آن‌ها دارای دیابت نوع ۲ هستند؛ هم‌چنین برآورد می‌شود که حدود ۱۷۹ میلیون نفر از مبتلایان به دیابت، از بیماری خود آگاه نباشند. پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰٤۰، تعداد مبتلایان به دیابت به ٦٤۲ میلیون نفر برسد.[۱،۲] روند رو به رشد جهانی چاقی و استفاده از رژیم‌های پرکالری منجر به افزایش تعداد بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ شده است.[۲] در ایران، شیوع دیابت نوع ۲ حدود ۷ تا ۷/۷ درصد در جمعیت بالغ ۲۵ تا ٦۵ ساله گزارش شده است که حدود دو میلیون نفر را شامل می‌شود.[۳] اختلال در سلول‌های بتای پانکراس و مقاومت به انسولین در اندام‌های هدف افراد مبتلا به دیابت نوع ۲، موجب افزایش غلظت گلوکز در خون می‌شود.[۲،٤]

دیابت نوع ۲ با کاهش تولید اکسید نیتریک (NO)[i] از اندوتلیوم همراه است که ناشی از آسیب سلول‌های اندوتلیال عروق توسط گلوکز بالای خون[۵] و کاهش عملکرد

i- Nitric oxide

آنزیم eNOS[i] (آنزیم سنتزکننده‌ی NO در سلول اندوتلیال) است.[۶،۷] نیترات، پیش‌تر به عنوان یک عامل زیان‌بار و سرطان‌زا در غذا و آب شناخته می‌شد.[۸] ایده‌ی زیان‌بار بودن نیترات در حال حاضر تاحد زیادی زیر سئوال رفته است و اثرات متابولیک و فیزیولوژیک مفیدی از نیترات به ویژه در اختلالات متابولیکی گزارش شده است.[۹] مطالعات اخیر نشان داده‌اند که نیتریت و نیترات، منبعی برای NO به ویژه از مسیر نیترات– نیتریت– NO هستند و در موارد کمبود تولید NO، مانند دیابت، می‌توانند به عنوان جایگزین و پشتیبان عمل کنند.[۱۰،۱۱] نیترات رژیم غذایی اثرات محافظتی در برابر دیابت دارد.[۱۲] یافته‌های مطالعات حیوانی نشان می‌دهند که NO مسیر سیگنالینگ انسولین و برداشت گلوکز را تقویت می‌کند و مقاومت به انسولین و عوارض دیابت را کاهش می‌دهد.[۱۲]

حدود ۳۰ درصد افراد دیابتی، کم‌خونی دارند[۱۳] که ناشی از اختلال عملکرد کلیه، آلبومین‌اوری و نقص اریتروپویتین[۱۴] است.[۱۵] در مبتلایان به دیابت نوع ۲، تعداد پلاکت‌ها[۱۶] و نوتروفیل‌ها افزایش می‌یابد.[۱۷] در چاقی و اختلال تحمل گلوکز، تعداد گلبول‌های سفید افزایش می‌یابد که با افزایش خطر بروز دیابت نوع ۲ همراه است.[۱۸] نشان داده شده است که تجویز غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات سدیم به مدت شش‌ماه در موش‌های صحرایی سبب کاهش هموگلوبین و تعداد اریتروسیت‌ها و مونوسیت‌ها می‌شود، اما تعداد لنفوسیت‌ها را افزایش می‌دهد.[۱۹] در موش صحرایی، تجویز نیترات سدیم سبب کاهش میزان MCV[ii] (اندازه‌ی متوسط گلبول‌های قرمز) و افزایش میزان MCHC[iii] (غلظت هموگلوبولین در گلبول‌های قرمز) و MCH[iv] (متوسط هموگلوبین گلبول قرمز) می‌شود.[۲۰] با توجه به این که هم دیابت و هم نیترات سدیم بر شمارش سلول‌های خونی اثر دارند و هم‌چنین تجویز نیترات به عنوان درمان دیابت مطرح است، این مطالعه با هدف بررسی اثر درمان با دوزهای پایین و بالای نیترات سدیم بر شمارش سلول‌های خونی در موش‌های چاق و مبتلا به دیابت نوع ۲ انجام شد.

i-Endothelial NOS (eNOS)
ii- Mean Corpuscular Volume
iii- Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
iv - Mean Corpuscular Hemoglobin

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰۰–۱۸۰ گرم استفاده شد. موش‌ها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و در شرایط چرخه تاریکی – روشنایی ۱۲ ساعتی نگه‌داری شدند. موازین اخلاقی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد و مطالعه به تأیید کمیته سازمانی اخلاق در پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی رسید. (کد اخلاق: IR.SBMU.ENDOCRINE.REC.1395.198)

حیوانات به ٤ گروه (۸ سر موش در هر گروه)، شامل ۱) کنترل، ۲) کنترل+نیترات، ۳) دیابت و ٤) دیابت+نیترات تقسیم شدند؛ هر یک گروه‌های کنترل+نیترات و دیابت+نیترات به دو زیر گروه (۸ سر موش در هر زیرگروه) تقسیم شدند : الف– کنترل+نیترات ۱۰۰ (CN100)، ب– کنترل + نیترات ۲۵۰ (CN250) که به ترتیب مدت دو ماه آب آشامیدنی حاوی ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم نیترات سدیم دریافت کردند، ج– دیابت+نیترات۱۰۰ (DN100) و د– گروه دیابت+نیترات ۲۵۰ (DN250). موش‌های دیابتی همراه با رژیم پرچرب، به مدت دو ماه آب آشامیدنی حاوی ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم نیترات سدیم دریافت کردند.

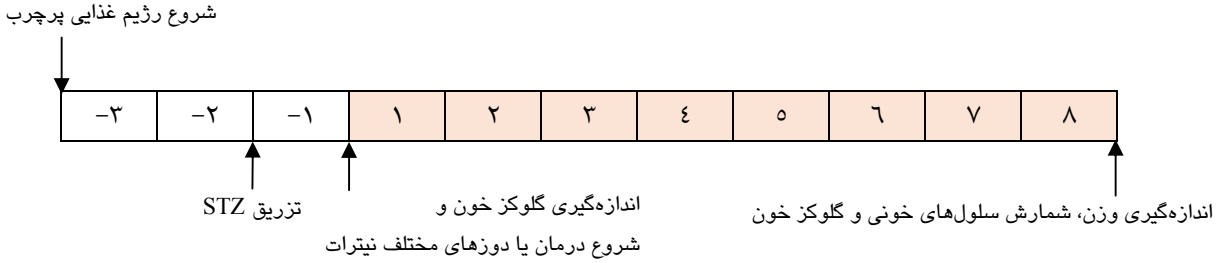
موش‌های گروه کنترل، رژیم معمولی (۵/۷ درصد چربی) و گروه دیابتی، رژیم پرچرب (۵۹ درصد چربی) دریافت کردند.[۲۱] جهت القای دیابت نوع دو، موش‌ها به مدت ۲ هفته غذای پر چرب دریافت کردند. روز چهاردهم ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استرپتوزتوسین[v] (STZ) به صورت داخل صفاقی تزریق شد.[۲۲] گروه کنترل، حلال STZ (بافر سیترات) را به میزان ۲ میلی‌لیتر به ازای کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. جهت تأیید القای دیابت، بعد از یک هفته از تزریق استرپتوزتوسین، خون‌گیری از دم انجام شد و سطح گلوکز ناشتا در سرم اندازه‌گیری شد. چنان‌چه گلوکز خون ناشتا بیشتر از۱۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود، دیابت تأیید می‌شد.[۲۳] سپس گروه‌های کنترل+نیترات و دیابت+نیترات، به مدت دو ماه آب آشامیدنی حاوی ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم نیترات سدیم دریافت کردند.

اندازه‌گیری وزن حیوانات توسط ترازوی دیجیتالی با حساسیت یک صدم گرم انجام شد.[۲۴] جهت اندازه‌گیری گلوکز

v-Streptozotocin

ناشتا و شمارش سلول‌های خونی، خون‌گیری از دم صورت گرفت. خون در لوله‌هایی حاوی ماده ضد انعقاد اتیلن دی آمین تترا استیک اسید[i] (۱/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر **EDTA** به ازای هرمیلی‌لیتر خون) ریخته شد.[۲۵] شمارش تعداد سلول‌های خونی در پایان مطالعه توسط دستگاه **Sysmex** مدل **Kx-۲۱N** انجام شد. ضرایب تغییرات درون آزمونی و برون آزمونی برای تمام پارامترها کمتر از ۳ درصد بود (نمودار ۱).

اندازه‌گیری گلوکز به روش رنگ‌سنجی آنزیمی (کیت شرکت پارس آزمون، ایران) و با استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا صورت گرفت. ضرایب تغییرات درون آزمونی و برون آزمونی برای اندازه‌گیری گلوکز به ترتیب ٤/٥ درصد و ٥/٦ درصد بود.



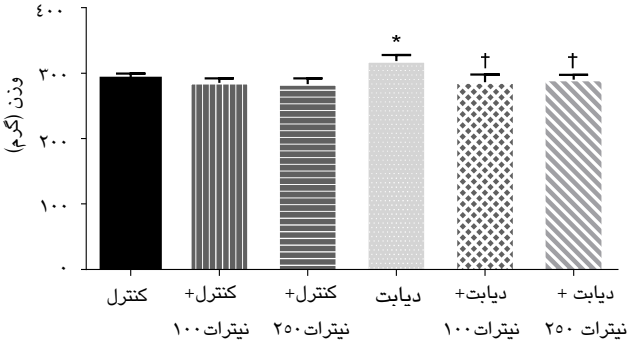
نمودار ۱- نمای کلی از مراحل اجرای مطالعه. CBC[ii]، شمارش سلول‌های خونی؛ STZ، استرپتوزوتوسین

تحلیل آماری

تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار Graph Pad Prism (Version 6) انجام شد. داده‌ها به صورت کمی بودند که به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شدند. تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون فیشر تعقیبی برای تحلیل داده‌های وزن، گلوکز و سلول‌های خونی انجام شد. P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

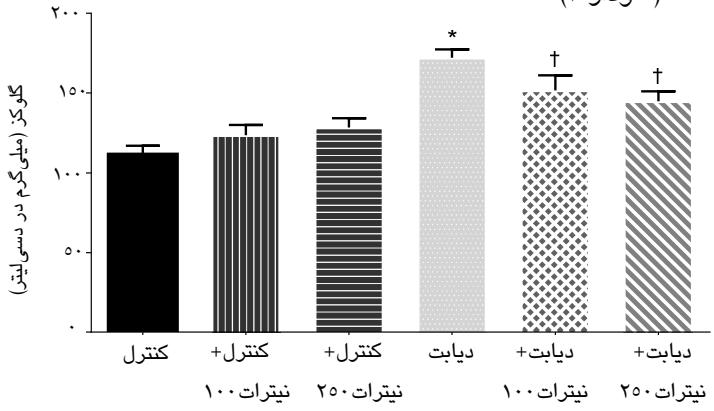
در پایان مطالعه، وزن موش‌های گروه دیابتی (D) به طور معنی‌داری (p=۰/۰٤٤) بیشتر از گروه کنترل (C) بود. تجویز نیترات سدیم اثری بر وزن حیوانات در گروه‌های کنترل نداشت، اما در موش‌های دیابتی سبب کاهش معنی‌دار وزن شد (p<۰/۰۵) (نمودار ۲).



نمودار ۲- تأثیر نیترات سدیم با دوز ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر بر وزن موش‌های صحرایی نر در گروه‌های کنترل و دیابتی در پایان مطالعه. داده‌ها بیان‌گر میانگین±خطای معیار، n=۸ .

* بیان‌گر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل است (p=۰/۰٤٤)، و † تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه دیابتی را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵).

در پایان مطالعه، میزان قند خون موش‌های دیابتی بالاتر از موش‌های کنترل بود. تجویز نیترات سدیم در گروه‌های کنترل اثری بر قند خون حیوانات نداشت، اما در موش‌های دیابتی سبب کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۵) گلوکز خون شد. (نمودار ۳).

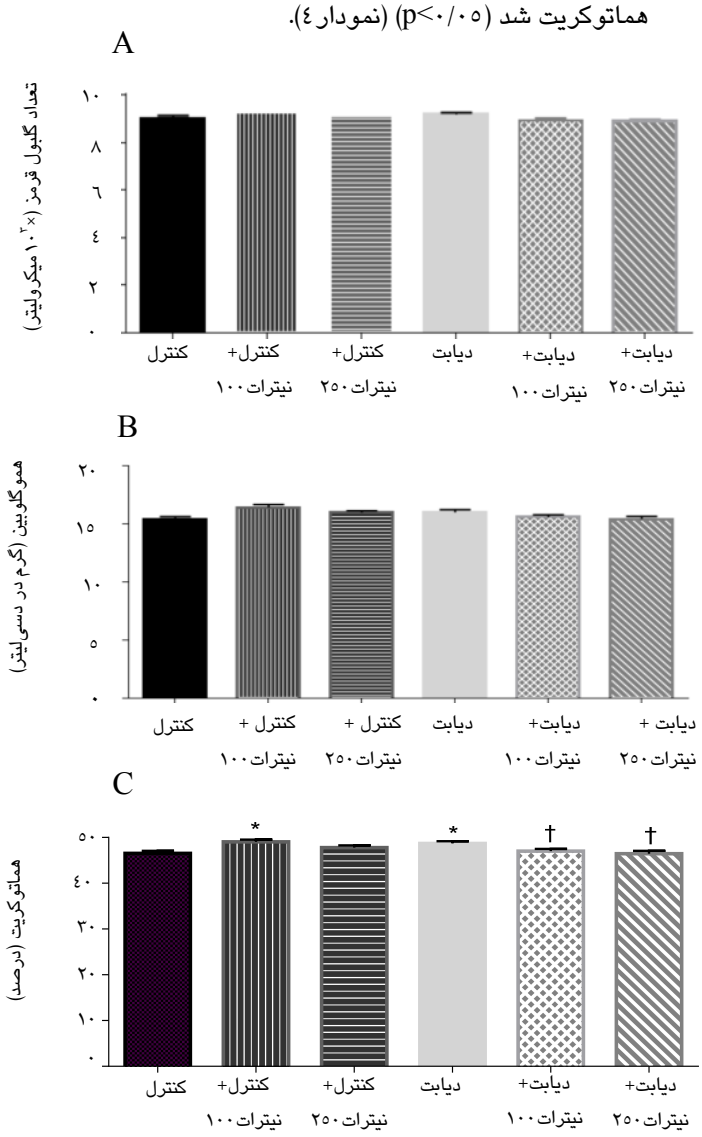


نمودار۳ - تأثیر نیترات سدیم با دوز ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر بر گلوکز خون موش‌های صحرایی نر در گروه‌های کنترل و دیابتی در پایان مطالعه. داده‌ها بیان‌گر میانگین±خطای معیار، n=۸ .

* بیان‌گر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل است (p<۰/۰۵)، و† تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه دیابتی را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵).

i- Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)
ii- Complete blood count

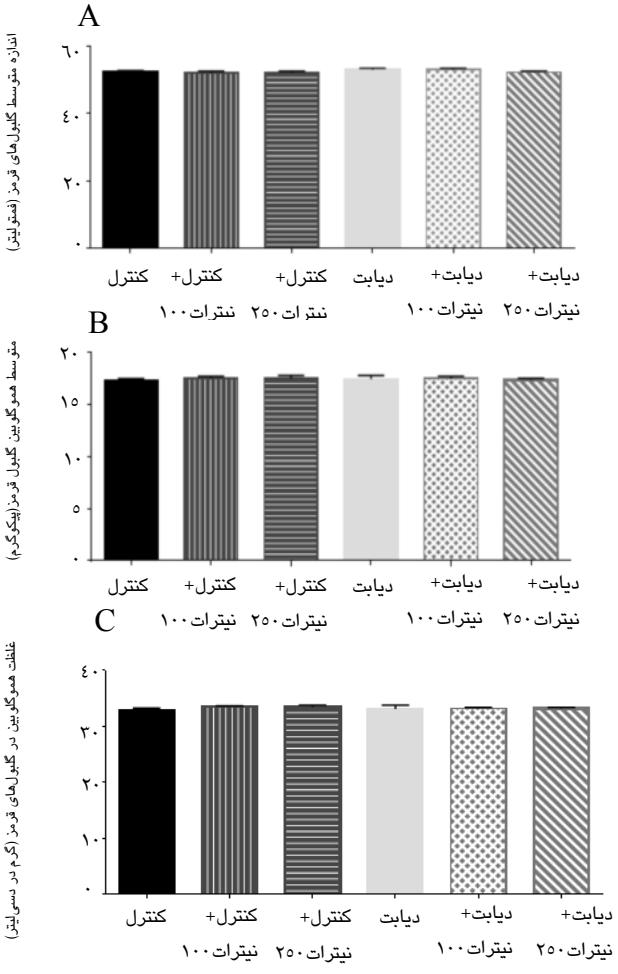
میزان هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز در گروه‌های کنترل و دیابتی در پایان مطالعه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد و هم‌چنین تجویز نیترات سدیم در گروه‌های کنترل و دیابتی، اثری بر تعداد گلبول قرمز و میزان هموگلوبین نداشت. (نمودار ٤). در پایان مطالعه، موش‌های دیابتی، هماتوکریت بالاتری در مقایسه با گروه کنترل داشتند و تجویز نیترات سدیم در گروه‌های دیابت +نیترات در هر دو دوز ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش معنی‌دار هماتوکریت شد ($p<۰/۰۵$) (نمودار٤).



نمودار۴- تأثیر نیترات سدیم با دوز ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر بر تعداد گلبول قرمز خون (A)، هموگلوبین خون (B) و درصد هماتوکریت خون در موش‌های صحرایی نر (C) در پایان مطالعه. داده‌ها بیان‌گر میانگین±خطای معیار، n=۸ .

* بیانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل است ($p<۰/۰۵$)، و † تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه دیابتی را نشان می‌دهد ($p<۰/۰۵$).

اندازه‌ی متوسط گلبول‌های قرمز (MCV)، غلظت هموگلوبولین در گلبول‌های قرمز (MCHC) و متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCH) در بین تمام گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (نمودار٥).

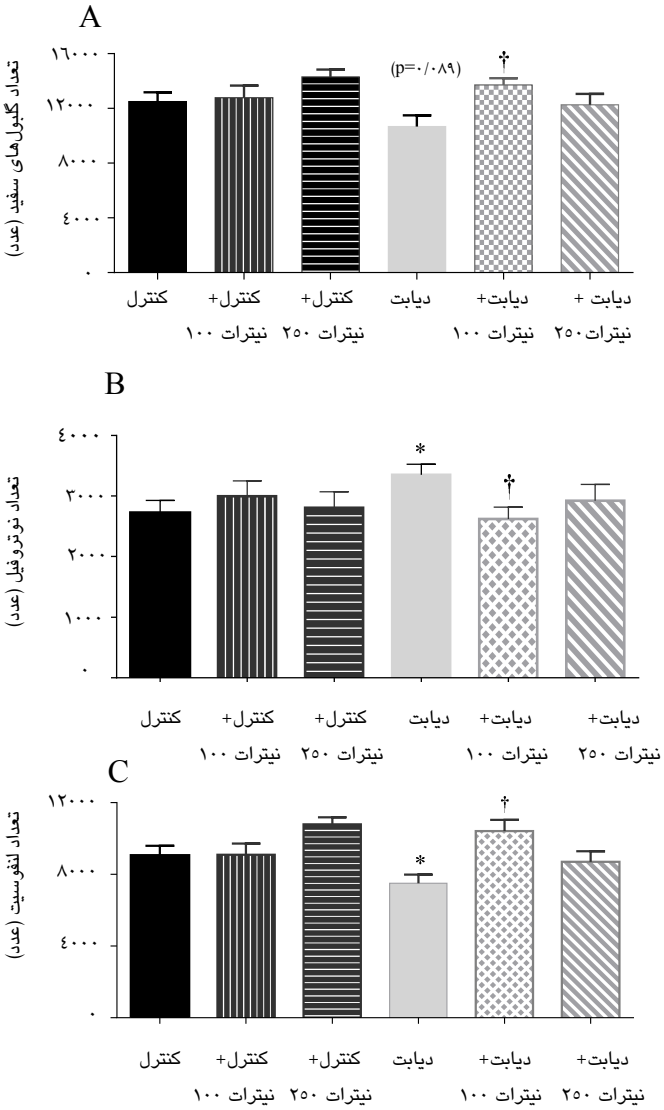


نمودار٥- تأثیر نیترات سدیم با دوز ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر بر مقدار MCV (A)، MCH (B) و MCHC (C) در موش‌های صحرایی نر در پایان مطالعه. داده‌ها بیان‌گر میانگین±خطای معیار، n=۸ .

همان‌طور که در نمودار ٦ دیده می‌شود، تعداد گلبول سفید در پایان مطالعه در گروه‌های کنترل و دیابت تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، اما تعداد گلبول‌های سفید در گروه دیابتی پایین‌تر از کنترل ($p=۰/۰۸۹$) بود. تجویز نیترات سدیم در گروه‌های کنترل اثری بر تعداد گلبول سفید نداشت، اما در موش‌های دیابتی دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات سبب افزایش تعداد گلبول سفید شد اما دوز ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر اثری نداشت.

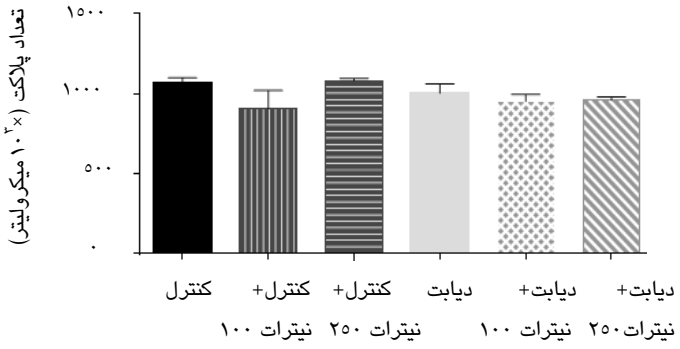
در پایان مطالعه، تعداد نوتروفیل‌ها در حیوانات دیابتی بالاتر از کنترل بود. تجویز نیترات سدیم در گروه‌های کنترل اثری بر تعداد نوتروفیل‌ها نداشت، اما در موش‌های دیابتی دوز ۱۰۰ سبب کاهش معنی‌دار تعداد نوتروفیل شد ($p<۰/۰۵$) و دوز ۲۵۰ اثری نداشت.

داده‌ها نشان دادند که تعداد لنفوسیت در پایان مطالعه در حیوانات دیابتی پایین‌تر از کنترل بود. تجویز نیترات سدیم در گروه‌های کنترل اثری بر تعداد لنفوسیت‌ها نداشت، اما در موش‌های دیابتی، دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات سدیم سبب افزایش معنی‌دار لنفوسیت شد ($p<۰/۰۵$) و دوز ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر اثری نداشت (نمودار ٦). تعداد پلاکت‌ها در تمام گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (نمودار۷).



نمودار۶- تأثیر نیترات سدیم با دوز ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر بر تعداد گلبول سفید خون (A)، تعداد نوتروفیل خون (B) و تعداد لنفوسیت خون در موش‌های صحرایی نر(C) در پایان مطالعه. داده‌ها بیانگر میانگین±خطای معیار، n=۸ .

* بیانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل است ($p<۰/۰۵$)، و † تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه دیابتی را نشان می‌دهد ($p<۰/۰۵$).



نمودار ۷- تأثیر نیترات سدیم با دوز ۱۰۰ و۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر بر تعداد پلاکت خون موش‌های صحرایی نر در پایان مطالعه. داده‌ها بیانگر میانگین ±خطای معیار، n=۸ .

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز نیترات سدیم به مدت دو ماه در موش‌های دیابتی سبب کاهش وزن بدن، قند خون، هماتوکریت و تعداد نوتروفیل‌ها می‌شود، تعداد کل گلبول‌های سفید و لنفوسیت را افزایش می اما اثری بر تعداد گلبول‌های قرمز، غلظت هموگلوبین و تعداد پلاکت ندارد.

تجویز نیترات در دوزهای ۱۰۰ و۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر، وزن موش‌های دیابتی را کاهش داد. همراستا با این نتیجه، گزارش شده که تجویز نیتریت در موش‌های صحرایی نر مبتلا به دیابت نوع ۲،[۲٦] موجب کاهش وزن و در موش‌های سوری چاق موجب کاهش توده‌ی بدنی می‌شود.[۲۷] در مطالعه‌ای دیگر، تجویز نیتریت و نیترات سدیم سبب کاهش وزن در موش‌های چاق ZSF1 شد.[۲۸] نیتریت و نیترات منبعی برای تولید NO از مسیر نیترات– نیتریت– NO به کمک آنزیم‌های سنتز کننده NO هستند. NO موجب افزایش گوانوزین مونوفسفات حلقوی (cGMP) می‌شود و بیوژنز میتوکندری را تحریک می‌کند که می‌تواند موجب کاهش وزن شود.[۲٦،۲۹]

در مطالعه‌ی حاضر، تجویز نیترات سدیم در موش‌های دیابتی موجب کاهش گلوکز خون شد. این یافته مطابق با مطالعه غیبی و همکاران[۲٦] به دنبال تجویز نیتریت سدیم در موش‌های صحرایی نر مبتلا به دیابت نوع ۲، اهتاکه[i] و

i-Ohtake

همکاران[۳۰] در موش‌های سوری دیابتی و هم‌چنین خلیفی و همکاران[۲۴] به دنبال تجویز نیترات سدیم در موش‌های صحرایی نر دیابتی است که همگی کاهش قند خون را نشان دادند. نیترات و نیتریت از طریق نیتروزیلاسیون و انتقال GLUT4 به غشا برداشت گلوکز را تسهیل و سبب کاهش مقاومت به انسولین می‌شوند.[۲۷] نیترات هم‌چنین از طریق افزایش ترشح انسولین، افزایش میزان جریان خون و کاهش استرس اکسیداتیو سبب افزایش تحمل گلوکز می‌شود.[۳۱]

در این پژوهش، تجویز نیترات سدیم تغییری در تعداد گلبول قرمز گروه‌های کنترل و دیابتی ایجاد نکرد. گزارش شده است که تجویز نیترات سدیم در موش‌های صحرایی سالم، در زمان کوتاه (۱۰ ساعت)، موجب افزایش تعداد گلبول‌های قرمز می‌شود، ولی در زمان طولانی (۲۰ روز)، اثری بر تعداد گلبول‌های قرمز ندارد. به نظر می‌رسد، آسیب اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب لیز شدن و کاهش تعداد گلبول قرمز در زمان کوتاه می‌شوند؛ در زمان طولانی‌تر، تولید گلبول قرمز افزایش و به حالت طبیعی اولیه برمی‌گردد. یون نیتریت، متابولیت‌های آن و محصولات پراکسیداسیون لیپیدی با گروه‌های سولفیدریل لیپیدها در غشاء دولایه لیپیدی و ترکیبات پروتئینی غشا اریتروسیت واکنش داده و ساختار آن‌ها را تغییر می‌دهد.[۲۰] برخلاف یافته‌های این مطالعه، در مطالعه‌ی شارما[i] و همکاران، تعداد گلبول قرمز در دوزهای ۱۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش، اما در غلظت ۲۵۰میلی‌گرم در لیتر افزایش نشان داد. عوامل ایجادکننده مت‌هموگلوبین نظیر نیترات موجب آنمی همولیتیک وابسته به دوز می‌شوند.[۳۲]

در این مطالعه، تجویز نیترات اثری بر مقدار هموگلوبین در گروه‌های کنترل و دیابتی نداشت. شارما و همکاران پس از ۱۲۰ روز تجویز نیترات سدیم با غلظت‌های ۴۵، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در آب آشامیدنی خرگوش‌ها، افزایش هموگلوبین در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و کاهش آن در دوزهای دیگر را گزارش کردند. تأثیر نیترات بر هموگلوبین پیچیده است و به عواملی مانند نسبت نیتریت به هموگلوبین، وجود اکسیژن یا کاهش اکسیژن بستگی دارد.[۲۲] در مطالعه‌ی دیگری غلظت‌های ۴۵، ۹۰ و ۱۳۵ میلی-گرم در لیتر پتاسیم نیترات در آب آشامیدنی موش‌های سفید آزمایشگاهی موجب افزایش هموگلوبین و هماتوکریت شد.

کاهش اکسیژن در خون، به طور غیرمستقیم بر مغز استخوان اثر کرده و تولید اریتروسیت را افزایش می‌دهد.[۳۳] تغییرات هماتولوژیک که به دنبال مواجهه‌ی مزمن با نیترات دیده می‌شود، می‌تواند به شکل کم‌خونی یا افزایش جبرانی در تعداد گلبول‌های قرمز باشد. به نظر می‌رسد مواجهه با نیترات می‌تواند سبب سرکوب مغز استخوان شود.[۳۴]

در این مطالعه، میزان هماتوکریت در گروه دیابتی بالاتر از گروه کنترل بود و تجویز نیترات سدیم در دوزهای ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر موجب کاهش هماتوکریت شد. هم جهت با این مطالعه، اشمور[ii] و همکاران اثر دوز پایین نیترات (۶۰ میلی‌گرم در لیتر در روز) را در موش‌های صحرایی بررسی کردند و نتیجه گرفتند که نیترات، میزان هماتوکریت افزایش یافته در طی هیپوکسی را کاهش می‌دهد، اما در دوزهای بالاتر (۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر روزانه) به طور عکس عمل می‌کند. نیترات بر تولید اریتروپویتین اثر دارد و مهارکننده‌ی تولید اریتروپویتین در کبد است که ۱۰ درصد اریتروپویتین را تولید می‌کند. نیترات در دوزهای بالاتر، تولید اریتروپویتین کلیوی را افزایش می‌دهد تا نیاز بافت به اکسیژن پاسخ داده شود.[۳۵]

در این مطالعه، تجویز نیترات اثری بر مقدار MCV، MCH، MCHC نداشت. هم جهت با این مطالعه، بوازیز[iii] و همکاران، اثر نیترات با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن موش را بر پارامترهای هماتولوژی بررسی کردند و تغییری در MCV، MCH، MCHC مشاهده نکردند.[۳۶] بر خلاف یافته‌ی حاضر، گلوچوآ[iv] و همکاران اثر نیتریت سدیم را بر پارامترهای خونی بررسی کردند و گزارش کردند که MCV در همه گروه‌ها کاهش، اما MCH و MCHC به طور معنی‌داری افزایش دارد. این تغییرات به دلیل کم‌خونی میکروسیتیک پس از مواجهه‌ی حاد با نیتریت سدیم است که البته در زمان طولانی‌تر (۲۰ روز) این اثرات مشاهده نشد.[۲۰] در مطالعه اگور[v] و همکاران، بر خلاف مطالعه حاضر، گزارش شد که نیتریت با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش MCH و MCHC، اما در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب کاهش MCH و MCHC می‌شود؛ نیترات با دوز پایین (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) اثر تحریکی بر مغز استخوان دارد که تولید گلبول قرمز را افزایش می‌دهد، اما در غلظت-

i-Sharma

ii- Ashmore
iii- Bouaziz
iv - Gluhchevaa
v - Ogur

های بالا (۴۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) این عمل مهار می‌شود.[۳۷]

داده‌های این مطالعه نشان داد که تعداد کل گلبول‌های سفید در موش‌های دیابتی کم می‌شود؛ تجویز نیترات اثری بر تعداد گلبول سفید در موش‌های کنترل نداشت، اما دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات در موش‌های دیابتی سبب افزایش تعداد گلبول‌های سفید شد. در مطالعه ابوهرفیل[i] و همکاران، نیتریت سدیم در غلظت‌های ۵۰،۲۵ و۱۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن، اثری بر تعداد گلبول سفید نداشت، ولی اثرات ضدالتهابی و مهار سیستم ایمنی مشاهده شد.[۳۸]

داده‌های این مطالعه نشان داد که تعداد نوتروفیل‌ها در موش‌های دیابتی بالاتر از گروه‌های دیگر بود و تجویز نیترات سدیم ۱۰۰ و۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت دو ماه موجب کاهش تعداد نوتروفیل شد. همچنین تعداد لنفوسیت‌ها در موش‌های دیابتی پایین‌تر از کنترل بود و تجویز نیترات سدیم۱۰۰ و۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت دو ماه موجب افزایش تعداد لنفوسیت شد. هم جهت با این پژوهش، تجویز نیترات با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن به مدت ۵۰ روز موجب کاهش تعداد نوتروفیل‌ها شد. نیترات با اثر بر مغز استخوان موجب افزایش تولید لکوسیت‌ها می‌شود.[۳۶] در مطالعه گاتسوآ[ii]، دوزهای۱۰۰ و۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات باعث کاهش تعداد مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها و افزایش لنفوسیت‌ها شد.[۱۹] در مطالعه‌ی حاضر، تجویز نیترات در موش‌های دیابتی سبب کاهش تعداد نوتروفیل‌ها و افزایش تعداد لنفوسیت‌ها و لذا کاهش نسبت نوتروفیل به لنفوسیت شد؛ گزارش شده است که این نسبت نشان‌دهنده‌ی بروز التهاب است.[۳۹]

در این پژوهش، تجویز نیترات اثری بر تعداد پلاکت‌های موش‌های کنترل و دیابتی نداشت. هم‌جهت با یافته های این پژوهش، سریهرون[iii] و همکاران در مطالعه‌ای in vitro دریافتند که نیتریت در غلظت‌های فیزیولوژیک اثری بر پلاکت پلاسما ندارد، اما در حضور اریتروسیت با تبدیل شدن به NO باعث مهار پلاکتی می‌شود.[۴۰] گزارش شده است که تعداد پلاکت‌ها در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ افزایش می‌یابد؛ هم‌چنین تجمع پلاکتی در افراد دیابتی بیشتر از افراد سالم است و این تجمع علت مهم آترواسکلروز و تنگی مجرای عروق در افراد دیابتی است.[۱۶،۴۱]

در بسیاری از مطالعات، اثرات نیترات بر سلول‌های خونی حیوانات سالم بررسی شده است، اما تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر نیترات بر سلول‌های خونی حیوانات دیابتی انجام نشده است که این موضوع می‌تواند نقطه قوت این مطالعه باشد. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به زمان کوتاه و هم‌چنین عدم اندازه‌گیری فاکتورهای خونی مؤثر بر سلول‌های خونی مانند اریتروپویتین اشاره کرد. هم‌چنین گزارش شده است که قند خون بالا می‌تواند سبب افزایش کاذب هماتوکریت شود که ممکن است بر نتایج این مطالعه در گروه‌های دیابتی تأثیر داشته باشد؛ اما این موضوع بیشتر در مورد قند خون بالای۶۰۰ میلی‌گرم در دسی لیتر صادق است، در حالی‌که در این مطالعه قند خون موش‌های دیابتی بین ۱۹۸–۱۶۲ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود و احتمالاً این موضوع اثری بر نتایج نداشته است.[۴۲]

از یافته‌های این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که تجویز نیترات سدیم به مدت دوماه سبب کاهش قند خون و وزن بدن در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌شود. نیترات، هماتوکریت و نوتروفیل را کاهش و تعداد کل گلبول‌های سفید و تعداد لنفوسیت‌ها را افزایش داد، ولی اثری بر تعداد گلبول‌های قرمز، مقدار هموگلوبین و تعداد پلاکت نداشت. در مجموع، با توجه به این که تجویز نیترات به عنوان یک عامل درمانی جدید در موش‌های دیابتی نوع ۲ مطرح است، می‌توان گفت این درمان اثر زیان‌بار عمده‌ای بر پارامترهای خونی ندارد و حتی با کاهش تعداد نوتروفیل‌ها ممکن است اثرات ضدالتهابی داشته باشد.

سپاسگزاری: نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مساعدت و همکاری گروه فیزیولوژی غدد پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در انجام این پژوهش ابراز می‌دارند.

این پژوهش با حمایت مالی مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد، طرح شماره ۹۴۱ انجام شده است.

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

i- Abuharfeil
ii- Gatseva
iii- Srihirun

References

1. Wang HJ, Jin YX, Shen W, Neng J, Wu T, Li YJ, et al. Low dose streptozotocin (STZ) combined with high energy intake can effectively induce type 2 diabetes through altering the related gene expression. Asia Pac J Clin Nutr 2007; 16 Suppl 1: 412-7.
2. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. Lancet 2017; 389: 2239-51.
3. Esteghamati A, Gouya MM, Abbasi M, Delavari A, Alikhani S, Alaedini F, et al. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in the adult population of Iran: National Survey of Risk Factors for Non-Communicable Diseases of Iran. Diabetes Care 2008; 31: 96-8.
4. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyper glycaemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach. Position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Diabetologia 2012; 55: 1577-96.
5. Schwartz D, Mendonca M, Schwartz I, Xia Y, Satriano J, Wilson CB, et al. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. J Clin Invest 1997; 100: 439-48.
6. Ghasemi A, Zahediasl S. Is nitric oxide a hormone? Iran Biomed J 2011; 15: 59-65.
7. Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE. Regulation of nitric oxide production in health and disease. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2010; 13: 97-104.
8. Katan MB. Nitrate in foods: harmful or healthy? Am J Clin Nutr 2009; 90: 11-2.
9. Ghasemi A, Zahediasl S. Potential therapeutic effects of nitrate/nitrite and type 2 diabetes mellitus. Int J Endocrinol Metab 2013; 11: 63-4.
10. Chow CK, Hong CB. Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. Toxicology 2002; 180: 195-207.
11. d'El-Rei J, Cunha AR, Trindade M, Neves MF. Beneficial Effects of Dietary Nitrate on Endothelial Function and Blood Pressure Levels. Int J Hypertens 2016; 2016: 6791519.
12. 12. Bahadoran Z, Ghasemi A, Mirmiran P, Azizi F, Hadaegh F. Beneficial effects of inorganic nitrate/nitrite in type 2 diabetes and its complications. Nutr Metab (Lond) 2015; 12: 16.
13. Lippi G, Mercadanti M, Aloe R, Targher G. Erythrocyte mechanical fragility is increased in patients with type 2 diabetes. Eur J Intern Med 2012; 23: 150-3.
14. McGill JB, Bell DS. Anemia and the role of erythropoietin in diabetes. J Diabetes Complications 2006; 20: 262-72.
15. Thomas MC, MacIsaac RJ, Tsalamandris C, Molyneaux L, Goubina I, Fulcher G, et al. Anemia in patients with type 1 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 4359-63.
16. Kodiatte TA, Manikyam UK, Rao SB, Jagadish TM, Reddy M, Lingaiah HK, et al. Mean platelet volume in Type 2 diabetes mellitus. J Lab Physicians 2012; 4: 5-9.
17. Zozulinska D, Wierusz-Wysocka B. Type 2 diabetes mellitus as inflammatory disease. Diabetes Research and Clinical Practice 2006; 74: S12-S6.
18. Lundberg JO, Weitzberg E. NO generation from inorganic nitrate and nitrite: Role in physiology, nutrition and therapeutics. Arch Pharm Res 2009; 32: 1119-26.
19. Gatseva P, Lazarova A, Maximova S, Pavlova K. Experimental data on the effect of nitrates entering the organism with the drinking water. Folia Medica 1996; 38: 75-83.
20. Gluhchevaa Y, Ivanovb I, Petrovaa E, Pavlovaa E, Vladova I. Sodium nitrite-induced hematological and hemorheological changes in rats. Series on Biomechanic 2012; 27: 53-8.
21. Mamikutty N, Thent ZC, Sapri SR, Sahruddin NN, Mohd Yusof MR, Haji Suhaimi F. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. Biomed Res Int 2014; 2014: 263897.
22. Mansor LS, Gonzalez ER, Cole MA, Tyler DJ, Beeson JH, Clarke K, et al. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. Cardiovasc Diabetol 2013; 12: 136.
23. Torres-Piedra M, Ortiz-Andrade R, Villalobos-Molina R, Singh N, Medina-Franco JL, Webster SP, et al. A comparative study of flavonoid analogues on streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats: quercetin as a potential antidiabetic agent acting via 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition. Eur J Med Chem 2010; 45: 2606-12.
24. Khalifi S, Rahimipour A, Jeddi S, Ghanbari M, Kazerouni F, Ghasemi A. Dietary nitrate improves glucose tolerance and lipid profile in an animal model of hyperglycemia. Nitric Oxide 2015; 44: 24-30.
25. Bain BJ, Bates I, Laffan MA. Dacie and Lewis Practical Haematology E-Book: Elsevier Health Sciences; 2016. Available from: URL/: https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=rEPUDAAAQBAJ&oi=fnd&pg.
26. Gheibi S, Bakhtiarzadeh F, Jeddi S, Farrokhfall K, Zardooz H, Ghasemi A. Nitrite increases glucose-stimulated insulin secretion and islet insulin content in obese type 2 diabetic male rats. Nitric Oxide 2017; 64: 39-51.
27. Ohtake K, Ehara N, Chiba H, Nakano G, Sonoda K, Ito J, et al. Dietary nitrite reverses features of postmenopausal metabolic syndrome induced by high-fat diet and ovariectomy in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 2017; 312: E300-E8.
28. Lai YC, Tabima DM, Dube JJ, Hughan KS, Vanderpool RR, Goncharov DA, et al. SIRT3-AMP-Activated Protein Kinase Activation by Nitrite and Metformin Improves Hyperglycemia and Normalizes Pulmonary Hypertension Associated With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. Circulation 2016; 133: 717-31.
29. Carlstrom M, Larsen FJ, Nystrom T, Hezel M, Borniquel S, Weitzberg E, et al. Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107: 17716-20.
30. Ohtake K, Nakano G, Ehara N, Sonoda K, Ito J, Uchida H, et al. Dietary nitrite supplementation improves insulin resistance in type 2 diabetic KKA(y). mice Nitric Oxide 2015; 44: 31-8.
31. de Castro Barbosa T, Jiang LQ, Zierath JR, Nunes MT. L-Arginine enhances glucose and lipid metabolism in rat L6 myotubes via the NO/ c-GMP pathway. Metabolism 2013; 62: 79-89.
32. Sharma M, Sharma H. Evaluation of the haematological responses to high nitrate exposure in rabbits. J Clin Diagn Res 2012; 6: 145-9.
33. Rawat S, Singh R, Bansode F, Singh P, Singh RP. Nitrate induced toxicity on some haematological parameters of Charles Foster rats. J Recent Adv Appl Sci 2013; 28: 35.

34. Ozmen O, Mor F, Sahinduran S, Unsal A. Pathological and toxicological investigations of chronic nitrate poisoning in cattle. Toxicological and Environmental Chemistry 2005; 87: 99-106.
35. Ashmore T, Fernandez BO, Evans CE, Huang Y, Branco-Price C, Griffin JL, et al. Suppression of erythropoiesis by dietary nitrate. FASEB J 2015; 29: 1102-12.
36. Bouaziz-Ketata H, Salah GB, Mahjoubi A, Aidi Z, Kallel C, Kammoun H, et al. Hyparrhenia hirta: A potential protective agent against hematotoxicity and genotoxicity of sodium nitrate in adult rats. Environ Toxicol 2015; 30: 1275-84.
37. Ogur R, Korkmaz A, Hasde M. Effects of high nitrate intake in rats. J Basic Clin Physiol Pharmacol 2000; 11: 47-56.
38. Abuharfeil N, Sarsour E, Hassuneh M. The effect of sodium nitrite on some parameters of the immune system. Food Chem Toxicol 2001; 39: 119-24.
39. Tokgoz S, Keskin S, Kayrak M, Seyithanoglu A, Ogmegul A. Is neutrophil/lymphocyte ratio predict to short-term mortality in acute cerebral infarct independently from infarct volume? J Stroke Cerebrovasc Dis 2014; 23: 2163-8.
40. Srihirun S, Sriwantana T, Unchern S, Kittikool D, Noulsri E, Pattanapanyasat K, et al. Platelet inhibition by nitrite is dependent on erythrocytes and deoxy-genation. PloS One 2012; 7: e30380.
41. Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. Diabetes Care 2001; 24: 1476-85.
42. Mcpherson RA, Pincus M R. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods E-Book, Elsevier Health Sciences. 2017; 30-31.

Original Article

Effects of Oral Sodium Nitrate Administration on Cell Blood Count in Obese Type 2 Diabetic Male Rats

Khorasany V[1], Yaghmeai P[1], Tohidi M[3], Gheibi S[2], Varzandi T[2], Ghasemi A[2]

[1]Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, I.R. Iran, [2]Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences,Tehran, I.R. Iran, [3]Prevention of Metabolic Disorders Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.

e-mail: ghasemi@endocrine.ac.ir

Received: 09/08/2017 **Accepted**: 12/09/2017

Abstract

Introduction: Type 2 diabetes is one of the most common metabolic diseases. Nitrate has been introduced as a new therapeutic agent for type 2 diabetes. Considering that both diabetes and nitrate have some effects on blood cell count and 30% of diabetic patients have anemia, the aim of this study was to determine the effect of sodium nitrate on blood cell count in obese type 2 diabetic rats. Materials and Methods: Forty-eight male Wistar rats were divided into four groups: Control, Control + nitrate, Diabetes and Diabetes + nitrate. The groups that received nitrate (Control + nitrate, Diabetes + nitrate) again were divided into two subgroups, which received sodium nitrate (100 and 250 mg/L in drinking water) for two months: control+nitrate100 (CN100), control+nitrate 250 (CN250), diabetes+nitrate100 (DN100), and diabetes+nitrate250 (DN250). Diabetes was induced using a high-fat diet for 14 days and injection of streptozotocin. Blood cell count was performed at the end of the study. Results: In diabetic rats, nitrate administration reduced body weight, blood glucose, hematocrits, and neutrophils (all $p<0.05$) but increased total number of white blood cells and lymphocytes ($p<0.05$). Nitrate administration had no effect on the number of red blood cells, hemoglobin concentration, MCV, MCH, MCHC, or platelet numbers. Conclusion: Administration of sodium nitrate, which is considered as a therapeutic agent in type 2 diabetes, decreased blood glucose in the type 2 diabetic rats but had no major harmful effects on blood parameters; in addition, it may also have anti-inflammatory effects by decreasing the number of neutrophils.

Keywords: Type 2 diabetes, Nitrate, Cell blood count, Male rat