

ارزیابی فعالیت ماکروفاژها و نوتروفیل‌های آلوده به کاندیدا آلبیکنس رت‌های دیابتیک در محیط کشت

مریم مقتدایی^۱، احمد زواران حسینی^{۲*}، محمدحسین یادگاری^۳

۱- کارشناس ارشد قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد گروه ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

هدف: محققان یکی از علت‌های افزایش شیوع عفونت‌های قارچی از جمله کاندیدایازیس^۱ را در بیماران مبتلا به دیابت نقص ایمنی ذکر کرده‌اند که نقص در فعالیت ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها از آن جمله است. نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها از طریق مکانیسم‌های اکسیداتیو و غیراکسیداتیو در دفاع بر علیه کاندیداآلبیکنس شرکت می‌کنند.

مواد و روشها: در این تحقیق فاکتورهای پراکسید هیدروژن (واسطه اکسیژنی واکنش‌گر) و نیتریک اکساید (واسطه نیتروژنی واکنش‌گر) نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها در برابر کاندیدا آلبیکنس در مدل حیوانی موش صحرایی^۲ بررسی شد. با تزریق وریدی استریتوزوسین^۳ به میزان ۶۵ میلی‌گرم / کیلوگرم، مدل رت دیابتیک به دست آمد. سنجش فاکتور نیتریک اکساید براساس روش گریس^۴ و فاکتور پراکسید هیدروژن طبق روش والتراج و همکاران^۵ انجام شد. همچنین شمارش تعداد کلنی کاندیدا آلبیکنس روی محیط سابورودکستروز آگار در دو گروه سالم و دیابتیک انجام گرفت.

نتایج و بحث: نشان داد ماکروفاژهای گروه سالم در برابر کاندیدا آلبیکنس نسبت به گروه دیابتیک، نیتریک اکساید بیشتری تولید کردند و این اختلاف معنی‌دار بود ($P \leq 0/028$). نوتروفیل‌های گروه سالم نیز در برابر کاندیدا آلبیکنس در مقایسه با گروه دیابتیک نیتریک اکساید بیشتری تولید کردند ($P \leq 0/165$). در ارتباط با عامل پراکسید هیدروژن ماکروفاژها در دو گروه سالم و دیابتیک، تفاوت چندانی مشاهده نشد. ولی نوتروفیل‌های گروه دیابتیک در مقایسه با گروه سالم عامل پراکسید هیدروژن بیشتری تولید کردند ($P \leq 1$). در نوتروفیل‌های بدون تحریک گروه دیابتیک نسبت به گروه سالم افزایش تولید پراکسید هیدروژن مشاهده شد.

در شمارش تعداد کلنی کاندیدا آلبیکنس بین دو گروه سالم و دیابتیک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P \leq 0/058$) و بین شمارش تعداد کلنی کاندیدا آلبیکنس و پاسخ‌های ایمنی مورد بررسی در این تحقیق ارتباطی وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: اگر چه عوامل وابسته به اکسیژن و نیتروژن پس از ابتلا به دیابت دچار تغییر، مثلاً کاهش، می‌شوند؛ ولی تغییرات در سایر عوامل سیستم ایمنی را نمی‌توان نادیده انگاشت.

کلید واژگان: دیابت، نوتروفیل، ماکروفاژ، کاندیدا آلبیکنس، نیتریک اکساید، پراکسید هیدروژن، رت.

۱- مقدمه

دیابت ملیتوس شایع‌ترین بیماری غدد درون‌ریز و مهم‌ترین عقیده عمومی این است که استعداد ابتلا به عفونت‌ها در افراد بیماری متابولیک در انسان گزارش شده است [۱، ۲].

E-mail: zavarana@modares.ac.ir

1. Candidiasis
2. Rat

3. Streptozocin
4. Griess

5. Walter-Ruch

* نشانی مکاتبه: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی تلفن: ۳۳۷۷، ۳۰۹۰، ۸۸۰۱۱۰۰۱-۰۲۱، دورنگار: ۸۸۰۰۷۸۳۰

حد طبیعی نمی‌رسد [۳].

تحقیقات نشان داده که پاسخهای ایمنی علیه کاندیدا آلیکنس مجموعه‌ای از مکانیسم‌های سلولی و هومورال به همراه مکانیسم‌های غیراختصاصی (ایمنی طبیعی) است. ایمنی وابسته به سلول یکی از مکانیسم‌های دفاعی مهم در سطوح مخاطی است و سلولهای CD4⁺T در جلوگیری از عفونتهای کاندیدایی پوست یا ناحیه معده و روده‌ای نقش مهمی دارند؛ ولی باید متذکر شد با وجود تحقیقات فراوان، اهمیت نقش ایمنی هومورال در مقابله با عفونتهای کاندیدایی هنوز به خوبی مشخص نشده است [۱۱].

نوتروفیلها و ماکروفاژها در برابر کاندیدا آلیکنس نقش اصلی را به عهده دارند و از طریق مکانیسمهای اکسیداتیو و غیراکسیداتیو در دفاع شرکت می‌کنند، حذف کاندیدا آلیکنس از بافت به حضور پلی‌مورفونوکلترها مربوط است و تخریب ارگانسیم به‌وسیله هر دو راه میلوپراکسیداز و پراکسیداز هیدروژنی انجام می‌گیرد، ماکروفاژها هم از طریق تولید واسطه‌های اکسیژنی و نیتروژنی فعال قادر به انهدام کاندیدا آلیکنس هستند [۳]. در تولید نیتریک اکساید، نیتریک اکساید سنتاز القا شده و اکسید نیتریک را تولید و سپس به پراکسی نیتريت تبدیل می‌شود که برای باکتریها، قارچها، ویروسها و سایر پاتوژنها بسیار سمی است [۱۱، ۱۲]. هدف از این تحقیق بررسی احتمال نقص در فعالیت نوتروفیلها و ماکروفاژهای رت‌های مبتلا به دیابت در مقابل کاندیدا آلیکنس است.

۲- مواد و روشها

۲-۱- تهیه حیوان مورد مطالعه

برای انجام آزمایشات، از موش رت استفاده شد. نژاد مورد نظر برای مطالعه و اجرای این تحقیق نژاد اسپراگ داوولی^۴ با وزن ۲۵۰ تا ۳۵۰ گرم (از انستیتو سرم و واکسن‌سازی رازی) و همگی جنس نر بوده و در شرایط یکسان نگهداری شدند. در این مطالعه دو گروه سالم و دیابتیک (۱۰ تا ۱۲ رت در هر گروه) به‌کار گرفته شد. رت‌های دیابتیک با تزریق داروی استرپتوزوسین (فارماسیا - آمریکا - ۲۰۰۲)^۵ به موشهای سالم به‌دست آمد.

۲-۲- مبتلا کردن حیوان به دیابت

داروی استرپتوزوسین به مقدار ۶۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان به دم رت تزریق شد. با محاسبه وزن حیوان و میزان

عفونتها خط سیر پیچیده‌تری داشته و مشکلات و گرفتاریهای بیشتری را در افراد دیابتیک ایجاد می‌کنند [۴، ۳]. همچنین شیوع عفونتها تقریباً با میزان متوسط گلوکز پلاسما در ارتباط است [۵]. از جمله عفونتهای شایع قارچی در افراد دیابتیک، می‌توان به کاندیدایازیس - موکورومایکوزیس - آسپرژیلوزیس و درماتوفیتوزیس اشاره کرد [۶].

کاندیدایازیس عفونت اولیه یا ثانویه‌ای است که به‌وسیله گونه‌های جنس کاندیدا و به‌طور اعم با کاندیدا آلیکنس ایجاد می‌شود [۷، ۸]. از جمله عوامل مستعدکننده کاندیدایازیس می‌توان به دیابت، نقص سیستم ایمنی در اثر درمانهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، بیماریهای ایمنی‌شناختی (به‌طور مثال سندرم نقص ایمنی اکتسابی یا نقص میلوپراکسیداز)، بدی تغذیه، حاملگی، استفاده از قرصهای ضدبارداری، درمان با آنتی‌بیوتیکهای وسیع‌الطیف و کورتیکواستروئیدها، اعتیاد مزمن به الکل و حضور کاتترهای داخل وریدی اشاره کرد [۹، ۱۰]. کاندیدا در افراد دیابتیک میل به موضعی شدن دارد و انواع گرفتاریهای جلدی - مخاطی را ایجاد می‌کند. رایج‌ترین شکل عفونی کاندیدایازیس، ایتترتریگو^۱، پارونیشیا و انیکومایکوزیس است [۶].

اگرچه علت این حساسیت غیرعادی هنوز شناخته نشده؛ ولی نقص ایمنی را یکی از علت‌های افزایش شیوع عفونتهای قارچی می‌دانند [۳، ۶]. با وجود طبیعی بودن غلظت آنتی‌بادی سرمی سیستم ایمنی هومورال^۲ در افراد دیابتیک، بین افراد سالم و دیابتیک اختلاف در سیستم ایمنی اولیه (ذاتی) مشاهده شده است. کاهش و تخریب جلب شیمیایی^۳، آسیب فاگوسیتوزیس، افزایش چسبندگی نوتروفیل‌ها به اندوتلیوم رگی، کاهش دیپندز، تشکیل آگزودای سلولهای پلی‌مورفونوکلتر و آسیب اعمال منوسیت و ماکروفاژها از دیگر نقص‌های ایمنی این افراد است [۳، ۶].

همچنین در ایمنی سلولی اکتسابی به مقدار ناچیزی مهار پاسخ ارشاح لنفوسیت‌ها نسبت به محرکهای مختلف در افراد دیابتیک ثابت شده است [۳]. در ایمنی ذاتی هومورال بیماران دیابتیک کاهش فاکتور ۴ کمپلمان و کاهش تولید سایتوکاین بعد از تحریک مشاهده می‌شود. چسبندگی میکروارگانسیم‌ها به سلولهای دیابتیک در آسیب‌زایی شیوع بالای عفونت در بیماران دیابتی با اهمیت است. با توجه به این‌که با تنظیم قندخون و کنترل بیماری دیابت، نقص‌های یاد شده اصلاح می‌شود، ولی به

4. Sprague dawley
5. Streptozocin (Pharmacia-USA-2002)

1. Intertrigo
2. Humoral Immunity
3. Chemotaxi

۲-۴- استخراج و کشت ماکروفاژهای رت

رت‌های هر دو گروه دیابتیک و سالم را حدود ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتا نگه داشته و بعد از بیهوش کردن حیوان و غوطه‌ور کردن در الکل ۷۰ درجه، در حالت استریل و در اتاق کشت از صفاق رت‌ها ماکروفاژ استخراج شد. به این ترتیب که ۳۰ میلی‌لیتر بافر هنکس^۶ ابتدا به صفاق تزریق کرده، سپس بعد از چند دقیقه مایع صفاق را جمع‌آوری کرده و در لوله حاوی هیپارین ریخته و سانتیفریژ شد. پس از سه بار شستن سلولها به وسیله محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ به حجم یک میلی‌لیتر رسانده و تعداد سلولها شمارش شد. در نهایت تعداد سلولها را به 2×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر رسانده و با استفاده از رنگ تریپان بلو^۷ ۰/۲٪ زنده بودن سلولها تعیین شد.

برای کشت ماکروفاژها از پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه‌ای فالكون استفاده شد. آزمایشات به صورت سه‌تایی انجام شد. در چاهک تست علاوه بر ماکروفاژ (2×10^6 سلول ماکروفاژ)، سوسپانسیون قارچ ($1/4 \times 10^7$ سلول) و در چاهک مثبت ایترفرن گامای نوترکیب (۱۰۰ ng/ml) و لیوپلی ساکارید (LPS) (۱۰۰ ng/ml) اضافه شد. پلیت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO₂ دار ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد و سپس مایع‌رویی برای آزمایش اندازه‌گیری نیتریک اکساید جمع‌آوری و فریز گردید.

چاهک‌های تست را سه بار با بافر هنکس شستشو داده و سپس پلیت را روی یخ قرار داده (۲۰ دقیقه) تا ماکروفاژها از کف پلیت کنده شوند، با آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۱ درصد سرم آلبومین گاوی و ۰/۰۱ درصد توینین، ماکروفاژها را لیز کرده و سوسپانسیون حاصل از لیز ماکروفاژها را درون میکرولوله استریل ریخته و سانتیفریژ شد، با دور ریختن مایع رویی حجم رسوب را به یک میلی‌لیتر رسانده و یک لوپ از سوسپانسیون حاصل را برای کشت روی محیط SCC کشت داده و پس از ۴۸ ساعت در انکوباتور ۲۸ درجه سانتیگراد کلنی‌های قارچ شمارش شد.

۲-۵- استخراج و کشت نوتروفیل‌های رت

بعد از خونگیری از قلب رت، نوتروفیلها با روش بایوم^۸ [۱۴] از خون کامل جدا شدند. در این روش، هم حجم خون کامل، دکستران ۵ درصد اضافه نموده و به آرامی مخلوط کرده، یک

دارو حدود ۲ میلی‌لیتر از داروی آماده با سرنگ انسولین به ورید دمی تزریق، در ۲۴ ساعت اول همراه با غذای فشرده به جای آب معمولی محلول ۵ درصد گلوکز در آب برای حیوان استفاده و پس از ۲۴ ساعت اول، آب معمولی به حیوان داده شد. از زمان تزریق دارو، بعد از ۷۲ ساعت قندخون برای اثبات دیابت اندازه‌گیری شد.

روش اندازه‌گیری قندخون، گلوکز اکسیداز و کیت موردنظر در اندازه‌گیری قندخون (پارس آزمون) در نظر گرفته شد. قندخون بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم درصد نشان‌دهنده وجود دیابت در حیوان است [۱۳].

۲-۳- تهیه کشت تازه و انبوه از کاندیدا آلیکنس

قارچ کاندیدا آلیکنس استاندارد سویه PTCC:۵۰۲۷ را درون لوله‌ها یا پلیت‌های حاوی محیط SCC کشت داد و ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا مخمرها رشد کنند. برای حصول اطمینان از سویه مورد نظر می‌توان آزمایشات افتراقی انجام داد. قارچ کاندیدا آلیکنس در محیط کورن میل آگار^۱ حاوی توینین^۲ ۸۰ (CMA+T۸۰)، کلایدوکونیدی^۳ (به همراه مسیلیوم^۴ - کاذب و بلاستوسپور) و همچنین در سرم در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد پس از دو ساعت لوله زایا تشکیل می‌دهد.

برای کشت متراکم ۱۵۰۰ میلی‌لیتر محیط گی‌پ^۵ ساخته و در ۵ ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری تقسیم گردید. مقداری از کلنی کاندیدا آلیکنس را در ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل کرده، سپس از این سوسپانسیون به ۵ ارلن حاوی محیط گی‌پ اضافه شد. ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار با دور ۱۰۰ و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد.

پس از زمان مورد نظر محیط کشت ارلن‌ها در لوله‌های درپیچ‌دار ۵۰ میلی‌لیتری استریل ریخته و در دور $3000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریژ کرده، سپس ۳ بار رسوب قارچ را با سرم فیزیولوژی استریل شسته، در آخر سلولهای مخمیری شسته شده و متراکم را با سرم فیزیولوژی کمی رقیق‌تر کرده و در لوله‌های درپیچ‌دار استریل در فریزر نگهداری شد.

1. Corn meal agar
2. Tween 80
3. Clamido conidia
4. Mycellium
5. Gyep

6. Hank's Buffer
7. Tripan Blue
8. Boyum

آن‌ها به وسیله دستگاه خواننده شد و با استفاده از منحنی استاندارد پراکسید هیدروژن و فلورسانس نمونه‌ها غلظت پراکسید هیدروژن محاسبه شد.

۲-۷- سنجش نیتریک اکساید

نیتریک اکساید بسیار ناپایدار بوده و نیمه عمری بین ۶ تا ۱۰ ثانیه دارد و سرعت در حضور اکسیژن به نیتريت (NO_2^-) تبدیل می‌شود. غلظت نیتريت در مایع رویی کشت سلولی به‌عنوان شاخص تولید اکسید نیتریک در نظر گرفته می‌شود و میزان آن با واکنش رنگ‌سنجی گریس^۲ تعیین گردید. با استفاده از غلظت‌های مختلف استاندارد (نیتريت سدیم) منحنی استاندارد ترسیم شده و از طریق رگرسیون و معادله خطی، غلظت نیتريت موجود در نمونه‌ها با استفاده از عدد جذب (OD) آنها محاسبه و به‌صورت میکرومولار نیتريت بیان گردید. لازم به یادآوری است که در طول موج ۵۴۰ نانومتر و فیلتر مرجع ۶۳۰ نانومتر میزان جذب خوانده شد.

۲-۸- سنجش H_2O_2 مایع رویی حاصل از کشت

نوتروفیلها و ماکروفاژهای رت

در این مطالعه از روش والتر راج^۳ و همکارانش استفاده شد [۱۵]. در این روش واکنش دو ماده هموآنیلک اسید و HRP با ماده پراکسید هیدروژن باعث تولید فلورسانس می‌شود و ارتباط خطی بین تولید پراکسید هیدروژن و فلورسانس وجود دارد که این ارتباط با رسم منحنی استاندارد به‌دست می‌آید.

۲-۹- آزمون آماری به‌کار گرفته شده

برای ورود اطلاعات و رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel و برای محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. از آنجا که تعدادی از متغیرها در دو گروه سالم و دیابتیک، دارای توزیع نرمال بودند از آزمونهای t-test استفاده شد. ولی در مواردی که تعداد داده‌ها کم بود و توزیع نرمال در داده‌ها وجود نداشت، استفاده از آزمونهای غیرپارامتری الزامی به نظر رسید. بنابراین از آزمونهای غیرپارامتری معروف و متداول استفاده شد. برای مقایسه دو جامعه مستقل، از آزمون من-ویتنی^۴ و برای مقایسه جوامع مستقل بیشتر از دو گروه، از آزمون کروسکال-والیس^۵ استفاده شد. برای محاسبه رابطه بین میزان جذب نیتریک اکساید

ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت.

مایع رویی که غنی از گلبولهای سفید است را به لوله دیگری که حاوی ۳ میلی‌لیتر فایکول^۱ بود اضافه نموده و در $2500 \times g$ به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی حاوی پلاسما، فایکول و لایه گلبولهای سفید تک هسته‌ای را دور ریخته و رسوب شامل نوتروفیل و تعداد کمی گلبول قرمز می‌باشد. تعداد کم گلبول قرمز را با محلول کلرید آمونیوم ۰/۸ درصد لیز کرده و سپس نوتروفیلها را با محیط RPMI-۱۶۴۰ شستشو داده و در حجم یک میلی‌لیتر سلولها را شمارش و تعیین درصد زنده بودن کردیم.

کشت نوتروفیلها در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای به‌صورت سه‌تایی انجام شد.

در چاهک آزمایش علاوه بر سوسپانسیون نوتروفیلی (2×10^6 سلول) و پلاسما رت، سوسپانسیون قارچی به میزان 2×10^7 سلول و در چاهک کنترل مثبت از فوربول مریستات استات (PMA) با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و در چاهک کنترل منفی تنها سلول نوتروفیل و پلاسما استفاده شد.

پلیت کشت سلولی به مدت ۸۰ دقیقه در انکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و پس از این زمان مایع رویی چاهک‌ها در میکرولوله برای سنجش فاکتور نیتریک اکساید در فریزر نگهداری شد.

۲-۶- کشت نوتروفیلها و ماکروفاژها برای

بررسی فاکتور H_2O_2

کشت سلولی به‌صورت سه‌تایی انجام شد. از ماده هورس رادیش پراکسیداز (HRP) و هموآنیلک اسید در این تست استفاده شد. در کنترل مثبت کشت نوتروفیلها، از فوربول مریستات استات در تحریک کردن نوتروفیلها استفاده شد. لازم به ذکر است در کشت ماکروفاژها کنترل مثبت نداشتیم و پس از ۸۰ دقیقه انکوباسیون لوله‌های کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد، بافر گلايسين - سود ۰/۱ مولار با pH ۱۲ که حاوی ۲۵ میلی مول EDTA بود، برای توقف واکنش استفاده شد، بعد از سانتریفوژ لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور $2200 \times g$ محلول رویی برای فلورومتری در نظر گرفته شد.

قابل ذکر است نمونه‌های آزمایش و کنترل مثبت و منفی گروههای سالم و دیابتیک برای سنجش فاکتور H_2O_2 نوتروفیلها به میزان یک به ده با بافر هنکس رقیق شد و میزان فلوروسانس

2. Griess
3. Walter Ruch
4. Mann-Witney
5. Kruskal-Wallis

1. Ficoll

نیتریک اکساید در نمونه‌های آزمایش و کنترل منفی گروه سالم اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. برای مقایسه میانگین جذب (غلظت) نیتریک اکساید در نمونه‌های آزمایش و کنترل مثبت و کنترل منفی در گروه دیابتیک از آزمون غیرپارامتری کروسکال-والیس استفاده شد و اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P \leq 0/341$).

۳-۲-۲- نتایج حاصل از لیز ماکروفاژها و کشت روی محیط SCC

مقایسه بین شمارش کلنی‌های کاندیدا آلبیکنس در دو گروه سالم و دیابتیک در سطح $\alpha=0/05$ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی با $\alpha=0/1$ این اختلاف معنی‌دار بود ($P \leq 0/058$).

۳-۲-۳- نتایج حاصل از آزمایش قندخون

بین میانگین غلظت قندخون ناشتای رت در دو گروه سالم و دیابتیک اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت ($P=0/000$).

۳-۳-۳- نتایج حاصل از ارزیابی فاکتور نیتریک اکساید در نوتروفیلها

برای ارزیابی فاکتور نیتریک اکساید بعد از جدا کردن نوتروفیلها از خون کامل رت و کشت آنها برای مقایسه داده‌ها از آزمون من-ویتنی در سطح معنی‌دار $\alpha = 0/05$ استفاده شد و نتایج زیر طبق جدول ۲ به‌دست آمد.

۳-۳-۱- نتایج حاصل از سنجش نیتریک اکساید

در مقایسه بین میانگین جذب (غلظت) نیتریک اکساید نمونه‌های آزمایش در دو گروه سالم و دیابتیک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بین میانگین جذب (غلظت) نیتریک اکساید کنترل مثبت در دو گروه سالم و دیابتیک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بین میانگین جذب (غلظت) نیتریک اکساید کنترل منفی در دو گروه سالم و دیابتیک تفاوت معنی‌داری دیده نشد.

برای مقایسه بین میانگین جذب (غلظت) نیتریک اکساید در نمونه‌های آزمایش و کنترل مثبت و منفی در گروه سالم از آزمون کروسکال-والیس استفاده شد و اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. برای مقایسه بین میانگین جذب (غلظت) نیتریک اکساید در نمونه‌های آزمایش و کنترل مثبت و منفی در گروه دیابتیک از آزمون کروسکال-والیس استفاده شد و اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد.

و غلظت آن و رسم نمودار استاندارد از مدل رگرسیون خطی و نمودار مناسب آن از نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج حاصل از تزریق استرپتوزوسین به حیوان

با تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر (۶۵ میلی‌گرم / کیلوگرم) استرپتوزوسین به ورید دم موش پس از ۳ روز (۷۲ ساعت) موش دیابتیک حاصل شد که با اندازه‌گیری قندخون ناشتای رت (۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتا) از طریق روش گلوکز اکسیداز قندخون ناشتای موش سالم در حدود (۵۳ تا ۱۸۸) میلی‌گرم درصد و قندخون ناشتای موش دیابتیک در حدود (۲۵۸ تا ۸۷۸) میلی‌گرم درصد به‌دست آمد. یادآور می‌شود که قندخون رت در حالت ناشتا به‌طور طبیعی در حدود ۵۰ تا ۱۳۵ میلی‌گرم درصد است.

۳-۲-۲- نتایج حاصل از کشت ماکروفاژ برای بررسی فاکتور نیتریک اکساید

در این بررسی چون توزیع داده‌ها در دو گروه سالم و دیابتیک از توزیع نرمال تبعیت می‌کرد، برای مقایسه شاخصهای مختلف در دو گروه مورد نظر از آزمون پارامتری t در سطح معنی‌دار $\alpha = 0/05$ استفاده شد و نتایج طبق جدول ۱ به‌دست آمد.

۳-۲-۳- نتایج حاصل از سنجش نیتریک اکساید

بین میانگین جذب نیتریک اکساید (غلظت نیتریک اکساید) نمونه‌های آزمایش در دو گروه سالم و دیابتیک تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P \leq 0/028$). بین میانگین جذب نیتریک اکساید (غلظت نیتریک اکساید) نمونه‌های کنترل مثبت در دو گروه سالم و دیابتیک تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P \leq 0/027$). بین میانگین جذب (غلظت) نیتریک اکساید نمونه‌های کنترل منفی در دو گروه سالم و دیابتیک تفاوت معنی‌داری در سطح $\alpha = 0/05$ مشاهده نشد. ولی با $\alpha = 0/1$ این تفاوت معنی‌دار بود ($P \leq 0/057$). بین میانگین جذب (غلظت) نیتریک اکساید نمونه‌های آزمایش، کنترل مثبت و منفی در گروه سالم با استفاده از مدل پارامتری ANOVA اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P=0/000$) و این اختلاف در بین نمونه آزمایش و کنترل مثبت معنی‌دار بود ($P=0/000$). بین میانگین جذب (غلظت) نیتریک اکساید در دو نمونه کنترل منفی و کنترل مثبت گروه سالم اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P=0/000$) ولی بین میانگین جذب (غلظت)

گروه سالم و دیابتیک از آزمون غیرپارامتری من-ویتنی در سطح $\alpha=0/05$ استفاده شد و طبق جدول ۲ نتایج زیر به دست آمد.

۳-۵-۱- بررسی فاکتور پراکسید هیدروژن

در مقایسه بین میانگین غلظت پراکسید هیدروژن در نمونه‌های آزمایش دو گروه سالم و دیابتیک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بین میانگین غلظت پراکسید هیدروژن در نمونه‌های کنترل مثبت دو گروه سالم و دیابتیک معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین در مقایسه بین میانگین غلظت پراکسید هیدروژن در نمونه‌های کنترل منفی دو گروه سالم و دیابتیک اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. برای مقایسه بین غلظت‌های پراکسید هیدروژن در نمونه‌های آزمایش و کنترل مثبت و کنترل منفی در گروه سالم از آزمون غیرپارامتری من-ویتنی استفاده شد و تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد.

برای مقایسه بین میانگین غلظت‌های پراکسید هیدروژن در نمونه‌های تست و کنترل منفی در گروه دیابتیک از آزمون غیرپارامتری من-ویتنی استفاده شد و تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

۳-۵-۲- نتایج حاصل از اندازه‌گیری قندخون

بین میانگین غلظت قندخون ناشتا در دو گروه سالم و دیابتیک اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P=0/000$).

۴- بحث

در بررسی و مطالعه فاکتور نیتریک اکساید ماکروفاژها در برابر کاندیدا آلبیکنس بین دو گروه سالم و دیابتیک اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P \leq 0/028$). این بررسی نشان داد که ماکروفاژهای افراد دیابتیک در برخورد با کاندیدا آلبیکنس، نیتریک اکساید کمتری در مقایسه با افراد سالم تولید کردند و این اختلاف محسوس بود، بنابراین این کاهش در میزان نیتریک اکساید در نمونه‌های آزمایش حاکی از نقص و آسیب در اعمال ماکروفاژها دارد. از طرف دیگر کشت ماکروفاژها به تنهایی و بدون ایجاد تحریک در آنها (کنترل منفی)، در موش‌های دیابتیک نسبت به موش‌های سالم، نیتریک اکساید کمتری تولید کرد؛ ولی این اختلاف نسبت به نمونه‌های آزمایش کمتر بود و در سطح $\alpha=0/1$ این اختلاف معنی‌دار بود ($P \leq 0/057$).

۳-۳-۲- نتایج حاصل از اندازه‌گیری قندخون

بین میانگین غلظت قندخون ناشتا در دو گروه سالم و دیابتیک تفاوت معنی‌دار مشاهده شد ($P=0/000$).

۳-۳-۳- نتایج حاصل از لیز نوتروفیلها و کشت

روی محیط SCC

پس از لیز نوتروفیلها و کشت مایع حاصل روی محیط سابورودکستروز آگار، هیچ رشدی از کاندیدا آلبیکنس در دو گروه سالم و دیابتیک مشاهده نشد و از نظر شمارش کلنی‌های کاندیدا آلبیکنس هیچ داده‌ای به دست نیامد.

۳-۴-۱- نتایج حاصل از ارزیابی فاکتور پراکسید

هیدروژن در ماکروفاژها

برای بررسی فاکتور پراکسید هیدروژن در ماکروفاژهای دو گروه سالم و دیابتیک از آزمون غیرپارامتری من-ویتنی در سطح معنی‌دار $\alpha = 0/05$ استفاده شد و طبق جدول ۱ نتایج زیر به دست آمد.

۳-۴-۱- بررسی فاکتور پراکسید هیدروژن

بین میانگین غلظت پراکسید هیدروژن در نمونه‌های آزمایش بین دو گروه سالم و دیابتیک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بین میانگین غلظت پراکسید هیدروژن در نمونه‌های کنترل منفی بین دو گروه سالم و دیابتیک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. برای مقایسه بین میانگین غلظت پراکسید هیدروژن در نمونه‌های آزمایش و کنترل منفی در گروه سالم از آزمون من-ویتنی استفاده شد و در این رابطه اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P \leq 0/005$). برای مقایسه بین میانگین غلظت پراکسید هیدروژن در نمونه‌های آزمایش و کنترل منفی گروه دیابتیک از آزمون من-ویتنی استفاده شد و تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد ($P \leq 0/151$).

۳-۴-۲- نتایج حاصل از اندازه‌گیری قندخون

بین میانگین غلظت قندخون ناشتای رت در دو گروه سالم و دیابتیک اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P=0/000$).

۳-۵-۲- نتایج حاصل از ارزیابی فاکتور پراکسید

هیدروژن در نوتروفیلها

به منظور بررسی فاکتور پراکسید هیدروژن در نوتروفیل‌های دو

جدول ۱ مقایسه بین دو گروه سالم و دیابتیک در ارزیابی فاکتور نیتریک اکساید و پراکسید هیدروژن ماکروفاژها (برحسب نانو مولار)

شاخص	موش سالم	موش دیابتیک
میزان جذب نیتریک اکساید در نمونه آزمایش	۰/۲۶۴۷ ± ۰/۰۳۴۳	۰/۱۴۶۵ ± ۰/۱۵۲۴
میزان جذب نیتریک اکساید در کنترل مثبت	۰/۰۱۶۰ ± ۰/۰۱۲۶	۰/۰۹۸۰ ± ۰/۱۰۵۸
میزان جذب نیتریک اکساید در کنترل منفی	۰/۲۵۱۰ ± ۰/۰۶۸۸	۰/۱۴۷۱ ± ۰/۱۵۶۰
شمارش کلنی قارچ در محیط SCC (CFU/ml) (ارزیابی فاکتور نیتریک اکساید)	۴۷۳/۴۴۴ ± ۱۹۶/۰۵۷۲	۲۳۷/۱۸۱۲ ± ۳۵۲/۶۷۷۵
میزان قندخون موش در ارزیابی فاکتور NO (mg/۱۰۰)	۸۴/۹۰۴۸ ± ۱۷/۳۹۲۳	۵۰۵/۸۱۸۲ ± ۲۷۰/۱۷۰۲
میزان غلظت پراکسید هیدروژن در نمونه آزمایش (nmol)	۱۱/۵۲۲۲ ± ۰/۷۹۲۰	۱۱/۸۱۶۱ ± ۰/۴۷۱۱
میزان غلظت پراکسید هیدروژن در کنترل منفی (nmol)	۱۱/۰۴۲۰ ± ۰/۹۸۷۵	۱۰/۰۸۷۴۴ ± ۱/۱۹۵۷
میزان قندخون موش در ارزیابی فاکتور H ₂ O ₂ (mg/۱۰۰)	۷۸/۴۰۰ ± ۱۳/۸۵۸۰	۴۶۸/۴۰۰ ± ۱۶۲/۵۴۸۶

جدول ۲ مقایسه بین دو گروه سالم و دیابتیک در ارزیابی فاکتور نیتریک اکساید و پراکسید هیدروژن نوتروفیلها (برحسب نانو مولار)

شاخص	موش سالم	موش دیابتیک
میزان جذب نیتریک اکساید در نمونه آزمایش	۰/۰۳۸۰ ± ۰/۰۳۴۶	۰/۱۵۳۱ ± ۰/۲۲۹۱
میزان جذب نیتریک اکساید در کنترل مثبت	۰/۰۴۱۰ ± ۰/۰۳۵۳	۰/۱۴۷۹ ± ۰/۲۰۴۱
میزان جذب نیتریک اکساید در کنترل منفی	۰/۰۳۸۰ ± ۰/۰۳۲۲	۰/۱۵۶۹ ± ۰/۱۹۷۲
شمارش کلنی قارچ در محیط SCC (CFU/ml) (ارزیابی فاکتور نیتریک اکساید)	۸۳/۶۶۶۷ ± ۱۷/۸۳۴۳	۴۵۵/۵۰۰ ± ۹۳/۱۸۸۰
میزان قندخون موش در ارزیابی فاکتور NO (mg/۱۰۰)	۱۸/۶۲۸۶ ± ۳/۵۵۵۹	۲۰/۴۳۳۳ ± ۳/۸۸۷۹
میزان غلظت پراکسید هیدروژن در نمونه آزمایش (nmol)	۱۸/۸۶۶۷ ± ۳/۴۷۵۴	۱۹/۸۷۷۸ ± ۳/۵۳۸۱
میزان غلظت پراکسید هیدروژن در کنترل منفی (nmol)	۱۸/۸۵۷۱ ± ۶/۴۵۸۶	۲۰/۱۴۴۴ ± ۳/۹۸۷۰
میزان قندخون موش در ارزیابی فاکتور H ₂ O ₂ (mg/۱۰۰)	۶۷/۴۳۰۰ ± ۹/۶۴۰۰	۴۴۶/۵۰۰ ± ۱۰۸/۱۵۰۰

در این مطالعه نوتروفیلهای موش دیابتیک نسبت به موش سالم در برخورد با کاندیدا آلبیکنس نیتریک اکساید بیشتری تولید کردند و این افزایش تولید نیتریک اکساید در نوتروفیلهای بیماران دیابتی کاملاً محسوس بود هرچند این اختلاف در سطح $\alpha=0/05$ معنی دار نبود ($P \leq 0/165$). همچنین کشت نوتروفیلها به تنهایی (کنترل منفی) در گروه دیابتیک نسبت به گروه سالم در تولید نیتریک اکساید افزایش محسوسی را نشان داد. میانگین غلظت نیتریک اکساید نوتروفیلها در گروه دیابتیک ۴۱۷/۶۱ میکرومول بود در صورتی که در گروه سالم این میانگین به ۱۷۶/۴۹ میکرومول رسید. اما در مورد تولید نیتریک اکساید از نوتروفیلها، بیسواس^۳ و همکارانش در سال ۱۹۹۴ گزارش کرده بودند که گلبولهای سفید چند هسته‌ای در افراد دیابتیک نسبت به افراد

و-و- جی^۱ در سال ۱۹۹۵ افزایش تولید نیتریک اکساید در ماکروفاژهای دخیل در انهدام سلولهای بتای پانکراس را بیان کرد و پس از او در سال ۲۰۰۱، آهمت آیدین^۲ و همکارانش مقادیر بالاتری از نیتريت / نیترات پلاسمایی را در بیماران دیابتیک قبل و بعد از درمان در مقایسه با افراد کنترل مشاهده کردند. همچنین کاهش cGMP در افراد دیابتیک نوع دو در مقایسه با افراد سالم را بیان نموده، ولی علت این افزایش و کاهش را نامشخص اعلان کردند [۱۶].

در این مطالعه بین شمارش کلنی کاندیدا آلبیکنس در دو گروه سالم و دیابتیک تفاوت مشاهده شد ($P \leq 0/057$) که احتمالاً نشان‌دهنده نقش سایر پاسخهای ایمنی در این فرایند است.

1. WU G.
2. Aydin A.

3. Biswas

هیدروژن در حالت بدون تحریک، می‌تواند تحت اثر طول مدت بیماری دیابت باشد.

همچنین در سال ۱۹۹۶ ابو - ال - اسرار^۷ گزارش کرده بود نوتروفیل‌های بیماران دیابتی نوع یک که تحت اثر فوربول مرستات استات تحریک شده‌اند، تولید متابولیت‌های اکسیژنی را افزایش می‌دهند. در مطالعه ما نیز افزایش در تولید پراکسید هیدروژن در نمونه کنترل مثبت گروه دیابتیک نسبت به گروه سالم مشاهده شد، ولی تفاوت زیادی نداشت.

بر طبق گزارش دتا^۸ در سال ۱۹۹۶ هر چند تولید آنیون از نوتروفیل‌های بدون تحریک بیماران دیابتی طولانی مدت، به‌طور جزئی افزایش می‌یابد؛ ولی اختلاف آماری در این افزایش مشاهده نشده بود. با این نظریه در این تحقیق هم با وجود تفاوت در تولید پراکسید هیدروژن نوتروفیل‌ها در دو گروه دیابتیک و سالم اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد.

ماسامی^۹ و همکارانش در سال ۲۰۰۰ اظهار داشتند که افزایش تولید آنیون اکسیژن در نوتروفیل‌های بیماران دیابتی نوع دو مبتلا به عوارض دیابت (تریپاتی)، در پیشرفت گرفتاری‌های دیابت سهم است.

با توجه به بررسی‌های انجام شده می‌توان گفت در بیماران دیابتیک، افزایش در تولید متابولیت‌های اکسیژنی نوتروفیل‌ها در حالت بدون تحریک به بروز عوارض و گرفتاری‌های بیشتر در بیماران دیابتی منجر می‌گردد [۱۷]. در صورتی که نوتروفیل‌های این بیماران وقتی تحت اثر زایموزان^{۱۰} یا هر میکروارگانیسم دیگر تحریک شوند، در تولید متابولیت‌های اکسیژنی، کاهش نشان می‌دهند [۱۸].

با توجه به تحقیق انجام شده، افزایش تولید پراکسید هیدروژن در نوتروفیل‌های بدون تحریک (کنترل منفی) گروه دیابتیک نسبت به گروه سالم شاخص‌تر از دو نمونه کنترل مثبت و آزمایش بود.

با مطالعاتی که چندین محقق در سال‌های متوالی انجام دادند انفجار تنفسی سلول‌های پلی‌مورفونوکلتر بیماران دیابتیک را با استفاده از پدیده کمی لومینسانس ارزیابی شد. در این مطالعات کاهش فعالیت کمی لومینسانس پلی‌مورفونوکلترهای بیماران دیابتیک بعد از تحریک با فوربول مرستات استات در مقایسه با افراد سالم مشاهده شد در حالی که پلی‌مورفونوکلتر همین بیماران در حالت بدون تحریک فعالیت کمی لومینسانس بیشتری

سالم نیتریک اکساید بیشتری تولید می‌کنند، در این تحقیق با مطالعه‌ای که روی فاکتور پراکسید هیدروژن ماکروفاژهای رت انجام شد، تولید پراکسید هیدروژن در ماکروفاژهای نمونه آزمایش (ماکروفاژ در برخورد با کاندیدا آلبیکنس) در دو گروه سالم و دیابتیک تفاوت محسوسی نداشت و تقریباً یکسان بود. همچنین تولید فاکتور پراکسید هیدروژن در نمونه کنترل منفی گروه دیابتیک نسبت به گروه سالم تفاوت کمی داشت که در گروه دیابتیک با اختلاف جزئی کمتر از گروه سالم بود.

اما در ارتباط با فاکتور پراکسید هیدروژن در ماکروفاژها، کاستاگنا^۱ (۱۹۸۲) و گانونگ^۲ (۱۹۸۶) کاهش تولید در متابولیک‌های اکسیژن واکنش‌دهنده از منوسیت‌های بیماران دیابتیک را گزارش کرده بودند، همچنین در سال ۱۹۹۵ فنگ - یوا - چانگ^۳ و من - فانگ شایو^۴ نیز گزارشی ارائه کردند مبنی بر این‌که فعالیت انفجار تنفسی منوسیت‌های بیماران مبتلا به دیابت نوع دو، کاهش نشان می‌دهد و این کاهش می‌تواند تحت اثر افزایش قندخون باشد، در واقع افزایش غلظت گلوکز، انفجار تنفسی را مهار می‌کند. در همان سال پیرا^۵ و همکارانش نقش انسولین را در تولید پراکسید هیدروژن از ماکروفاژها بیان کردند، آنها نشان دادند که تولید پراکسید هیدروژن در رت‌های دیابتیک به‌طور شاخص در مقایسه با موارد کنترل کاهش نشان می‌دهد و این اثر با دخالت انسولین بهبود می‌یابد.

در بررسی و تحقیق روی فاکتور پراکسید هیدروژن نوتروفیل‌های رت در برخورد با کاندیدا آلبیکنس بین دو گروه سالم و دیابتیک تفاوت مشاهده شد که در گروه دیابتیک این مقدار بیشتر بود (میانگین غلظت در گروه سالم ۱۸/۶۳ نانومول، در صورتی که در گروه دیابتیک ۲۰/۴۳ نانومول بود). تفاوت بین نوتروفیل‌های گروه سالم و دیابتیک در حالت بدون تحریک (کنترل منفی) بیشتر بود و گروه دیابتیک پراکسید هیدروژن بیشتری را نسبت به گروه سالم تولید کردند (میانگین غلظت در گروه سالم ۱۷/۸۶ نانومول و در گروه دیابتیک ۲۰/۴۴ نانومول بود). در ارتباط با فاکتور پراکسید هیدروژن نوتروفیلی ویروز^۶ و همکارانش در سال ۱۹۸۷ گزارش کرده بودند. نوتروفیل‌های بدون تحریک بیماران دیابتیک در تولید پراکسید هیدروژن افزایش نشان می‌دهند در حالی که تولید آنیون اکسیژن در نوتروفیل‌های تحریک شده بیماران دیابتی کاهش نشان می‌دهد و این افزایش پراکسید

1. Castagna M.
2. Ganong
3. Chang F.Y.
4. Shaito M.F.
5. Periera D.
6. Wierusz

7. Abu-el-asras
8. Dotta. F.
9. Massamy
10. Zymozan

اختلاف معنی داری مشاهده نشد، بنابراین عدم اختلاف نشان می دهد که کاهش شدت کمی لومینسانس در گروه بیماران دیابتیک کنترل نشده بر اثر وجود اختلال در عمل بلع نیست؛ بلکه احتمالاً به علت اختلال در عمل کشندگی نوتروفیلها است [۴]. از این تحقیق می توان نتیجه گرفت که اگر چه عوامل وابسته به اکسیژن و نیتروژن پس از ابتلا به دیابت تغییر کرده و کاهش می یابد؛ اما امکان جبران و جایگزینی عوامل دیگر سیستم ایمنی این فرایند وجود دارد. همچنین الگوی دیابت در شروع ابتلا و در تداوم آن ممکن است یکسان نباشد و مطالعه و بررسی بیماران دیابتیک در طی دوران ابتلا، لازم است و زمینه های مساعدکننده تضعیف پاسخ ایمنی در آنها تعیین و در حد امکان کنترل شود، ضمناً سایر پاسخهای ایمنی نیز تحت مطالعه قرار گیرد.

نسبت به افراد سالم داشتند ولی در سال ۱۹۹۷ بالاسویی^۱ اختلافی بین کمی لومینسانس بعد از تحریک در نوتروفیلهای بیماران سالم و دیابتیک پیدا نکرد. او علت این امر را چنین بیان کرد که بیماران تحت مطالعه اش از نظر کنترل و تنظیم متابولیک دیابت در وضعیت بهتری قرار داشتند [۱۹].

اما در تحقیق و مطالعه پژوهی و همکارانش در سال ۱۳۷۹، مقادیر کمی لومینسانس لکوسیت های پلی مورفونوکلتر پس از تحریک با فوربول مریستات استات، در بیماران دیابتیک کنترل نشده و کنترل شده و افراد سالم اختلاف معنی داری را نشان ندادند، ولی در دو گروه بیماران دیابتیک کنترل شده و کنترل نشده این اختلاف معنی دار بود. از طرف دیگر بین مقادیر کمی لومینسانس حاصل از تحریک با فوربول مریستات استات با مقادیر حاصل از تحریک با زایموزان در دو گروه مورد نظر

۵- منابع

- [۱] آندرنولی، گریگز، کارپتر و لوسکالزو. مبانی طب سیسیل بیماریهای غدد درون ریز و متابولیت. مترجم: جعفرخانی محمد. چاپ دوم، تهران: مؤسسه انتشارات فرهنگی تیمورزاده، ۸۳۷-۸۶۳، ۱۳۸۰.
- [۲] عزیزی فریدون. بیماریهای غدد درون ریز فیزیوپاتولوژی، علایم، تشخیص و درمان. چاپ دوم، تهران: مرکز نشر دانشگاهی تهران، ۲۶۵-۲۷۱، ۱۳۷۰.
- [3] Geerling S.E. and Hoepelman A.I.M. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26: 259-265, 1999.
- [۴] پژوهی محمد، باستان حق محمدحسن، رجب اسدا... مسعود احمد و رستمی مریم. مطالعه عملکرد نوتروفیل هادر بیماران دیابتیک نوع اول به کمک روش کمی لومینسانس. مجله دانشکده پزشکی، ۳: ۴۶-۵۲، ۱۳۷۹.
- [5] Winocour P.H., Lenton J., Puxty J.A.H. and Anderson D.C. Leukocyte microbicidal activity assessed by chemiluminescence in elderly non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res.*, 9: 73-75, 1988.
- [6] Vazquez J.A. and Sobel J.O. Fungal infections in diabetes. *Infectious Disease Clinics of North America*, 9(1): 97-116, 1995.
- [7] Deepti Goswami, Ravinder Goswami, Uma Banerjee, Vatsla Dadhwal, Sunita Miglani, Ali Abdul Lattif and Narayana Kochupillai, -Pattern of Candida species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy, *Journal of Infection*, Volume 52, Issue 2, 111-117, 2006.
- [8] Kaufman C. A. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. The national institute for allergy and infectious diseases (NIAID) mycological study group. *Clin Infect Dis.*, 30(1): 14-18, 2000.
- [9] Suzanne E. Geerlings and Andy I. M. Hoepelman, Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM), *FEMS Immunology and Medical Microbiology* Volume 26, Issues 3-4, 259-265, 1999.
- [10] Kevin C.H. New and emmerging yeast pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4): 462-478, 1995.
- [11] Murphy J.W. Friedman H. and Bendinelli M. Fungal infections and immune responses. Plenum Press, New York, PP. 49-128, 1993.

- [12] Gabay J. and Nathan CF. Antimicrobial mechanisms of macrophages-mononuclear phagocytes, chapter 34, 259-267, 1992.
- [13] Wasan K.M. and Conklin J.S. Evaluation of renal toxicity and antifungal activity of free and liposomal Amphotericin B following a single intravenous dose to diabetic rats with systemic candidiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(8): 1806-1810, 1996.
- [14] Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combined centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21(suppl 97): 77-89, 1968.
- [15] Ruch W., Cooper Ph. H., and Baggiolini M. Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horseradish peroxidase. *J. Immunol. Methods*, 63:347-357, 1983.
- [16] Aydin A., et al. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clinical Biochemistry*, 34: 65-70, 2001.
- [17] Ohmori M., et al. The functions of circulatory polymorphonuclear leukocytes in diabetic patients with and without diabetic triopathy. *Life Sciences*, 66(19): 1861-1870, 2000.
- [18] Zozulinska D. A., et al. The influence of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) duration on superoxide anion and hydrogen peroxide production by polymorphonuclear neutrophils. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 33: 139-144, 1996.
- [19] Balasoui D., Kessel K.C., Kats-Renaud H.J., Collet T.J. and Hoepelman A.I. Granulocyte function in women with diabetes asymptomatic bacteriuria. *Diabetes Care*, 20: 392-395, 1997.