فحص التحول الارومي بأستخدام الانسولين كمستضد

روجان غانم محمد العلاف[1] ، محمد نجيب الشاهري[2]

[1] قسم علوم الحياة، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

[2] قسم الاحياء المجهرية ، كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: 29 / 12 / 2011 ---- تاريخ القبول: 8 / 5 / 2012)

الملخص

تناولت دراستنا الحالية استخدام الانسولين من مصادره الخارجية لمتابعة التحول الارومي Lymphoblast transformation للخلايا اللمفاوية التائية المعزولة من الدم المحيطي لدى (10) اشخاص مصابين بداء السكر ،(5) مصابين بالنمط الاول و(5) مصابين بالنمط الثاني ومقارنتهم بعينة السيطرة والتي ضمت (10) اشخاص معافين،حيث اضيف الانسولين بتركيز $(20)mcU/cm^3$ للمزارع الخلوية الحاوية على الخلايا اللمفاوية لمتابعة التحول الارومي ،اظهرت نتائج الدراسة ان جميع الخلايا اللمفاوية التائية لمرضى داء السكر النمط الاول في المزارع الخلوية ابدت استجابة مناعية تمثلت بحدوث التحول الارومي ،واظهرت الخلايا اللمفاوية التائية لمرضى داء السكر النمط الثاني تحول ارومي لمريض واحد فقط ،بينما الخلايا اللمفاوية للمرضى الباقين دون اى اثر لحدوث تحول ارومي .

الكلمات الدالة: التحول الارومي ، الانسولين،مستضد

المقدمة

يعد الانسولين مستضد ذاتي واساسي للمرضى المصابين بداء السكر النمط الاول [1].وهو عبارة عن بروتين قصير يتكون من (51) حامض اميني يشفرله من الجين المحمول على الذراع القصير للكروموسوم (11)(11p 15) ،يظهر الانسولين العديد من المحددات المستضدية(Epitopes) والتي تكون عرضه لمهاجمة الاجسام المضادة الذاتية [2] ،لوحظ وجود الاجسام المضادة الذاتية للأنسولين (IAAs) لدى الاطفال الذين لديهم استعداد وراثي لتطور داء السكر او لديهم اصابات فايروسية او قد تم معالجتهم بأنواع مختلفة من الادوية او لديهم احد امراض المناعة الذاتية ،وتحت هذه الظروف قد يحدث تحطيم لاحدى اليات التحمل المناعي لجزيئة الانسولين مما يؤدي في النهاية الى زيادة اوقله في الاستجابة للأنسولين [3].

اظهرت الفئران نوع Non-Obese Diabetic mice(NOD) استجابة مناعية ذاتية خلوية ،حيث قام [4] بعزل الخلايا اللمفاوية التائية من موقع قريب لخلايا جزر لانكرهانز للفئران نوع NOD ،ولاحظ كلا الباحثين وجود مجاميع من نسل او كلونات الخلايا التائية المساعدة (CD4 T-cell clones) بعد ظهور الانسولين كمستضد ذاتي على سطح خلايا جزر لانكرهانز ،وهذا الخلايا تكون في حالة تفاعل مع الأنسولين المفرزمن قبل تلك الخلايا [5].ولوحظ من خلال الدراسات ان الخلايا التائية السامة(CD8 T- cells) تستهدف الانسولين المعروض من قبل خلايا جزر لانكرهانز ،حيث تم عزل نسل او كلونات هذه الخلايا من خلايا جزر لانكرهانز لدى الفئران نوع NOD واطلق عليها اسم G9C8 وهذه الخلايا لها القابلية على التفاعل مع سلسلة B-chain لجزيئة الانسولين (15-23 amino acid[6]،وتزداد اعداد الخلايا التائية السامة (CD8 T-cells)التي تميز الانسولين لدى الفئران من نوع NOD[7].

السؤال المهم الذي يطرح نفسه هو: هل يوجد مستضد اساسي وضروري لتطور داء السكر ؟ وفي حالة المعالجة بالأنسولين هل ينطوي العلاج بالأنسولين على تفاعلات مناعية للأشخاص الخاضعين للعلاج به ، من خلال المتابعات للخلايا اللمفاوية التائية والتي لها القابلية على التفاعل مع الانسولين لدى الفئران الفتية وتطور الاجسام المضادة الذاتية للأنسولين لدى الانسان ساعدت في فرض نظرية اعتبار الأنسولين كمستضد ذاتي ضروري لتطور داء السكر النمط الاول ،الهدف من الدراسة هو استخدام الانسولين كمحفز لعملية التحول الارومي للخلايا اللمفاوية التائية لدى كل من مرضى داء السكر النمط الاول والثاني والذين يعانون من حالة hyperglycemia في محاولة لمعرفة قابلية الخلايا اللمفاوية التائية على اظهار الاستجابة المناعية عند تعرضها للأنسولين من مصادره الخارجية .

المواد وطرائق العمل

خضع لتجربة التحول الارومي بأستخدام الانسولين كمستضد (10) مرضى مشخصين بأصابتهم بداء السكر ،(5) مرضى مصابين بالنمط الاول من داء السكري و(5) مرضى مصابين بالنمط الثاني من داء السكر وبمستويات من تركيز السكر تراوحت بين (200−370)mg/dl لمرضى النمط الاول و(160−270) mg/dl لمرضى النمط الثاني ،مقارنة بعينة السيطرة والتي ضمت(10) اشخاص اصحاء.

- **قياس تركيز السكر في حالة الصيام**

اجري الاختبار وفق الطريقة اللونية الانزيمية Enzymatic Colorimetric بأستخدام عدة الفحص ، بأستخدام عدة الفحص Randoxالمجهزة من قبل الشركة البريطانيةRandox .

- **تعداد كريات الدم البيضاء White Blood Cells Count:**

عدد الخلايا البيضاء في 1mm3 = مجموع اعداد الخلايا البيضاء في اربع مربعات 4/(4sqmm) X=(200) .(Lewis and Bain,2001) [8] .

- **العد التمييزي لكريات الدم البيضاء Differential White Blood Cells Count:**

تم اجراء العد التمييزي لكريات الدم البيضاء عن طريق تثبيت مسحة رقيقة ومتجانسة من الدم ،ثم صبغت المسحة بصبغة لشمان (1.5-2 دقيقة) ثم خففت الصبغة بأستخدام محلول الفوسفات المنظم لمدة (8 دقائق) ،ثم غسلت الشريحة بالماء الاعتيادي وتركت لتجف ،وتم فحص (100خلية بيضاء) لكل عينة [9].

– فحص التحول الارومي بأستخدام الانسولين كمستضد Lymphoblast Transformation Test with insulin

اعتمد هذا الاختبار على استخدام الانسولين المجهز من قبل شركة Lilly الامريكية في اجراء فحص تحول الخلايا اللمفاوية الى خلايا ارومية (Blast cell) بدلاً من استخدام مادة (PHA) كمحفز للخلايا التائية، وذلك لأختبار قابليته على تحفيز الاستجابة الخلوية للخلايا اللمفاوية التائية لمرضى داء السكر طريقة العمل:

تضمنت خطوات العمل المراحل الاتية :

1- عزل الخلايا اللمفاوية Isolation of lymphocytes:[10]

- مزج حجم واحد من الدم الوريدي -EDTA مع حجم مماثل له من محلول الفوسفات المنظم PBS ليصبح الحجم الكلي (20سم^3).
- اضيف (3سم^3) من محلول الفايكول – هاي باك -Ficoll hypaque Histoprep كثافته النوعية (1.077 ±0.001mg/l) الى انبوب طرد مركزي معقم ونظيف،اضيف اليه (6 سم^3) من مزيج الدم ومحلول الفوسفات المنظم
- اجريت عملية الطرد المركزي لمدة (30)دقيقة عند (1600دورة /دقيقة).
- تكونت بعد عملية الطرد المركزي ثلاث طبقات متميزة والتي ضمت :

1- الطبقة العلوية الحاوية على البلازما المخففة.

2- الطبقة الثانية الحاوية على Ficoll-hypaque.

3-الطبقة الثالثة في القعر الحاوية على راسب من كريات الدم الحمراء وكريات الدم البيضاء الحبيبية

تظهر المنطقة ما بين طبقة البلازما المخففة وطبقة الفايكول Ficoll على شكل حزمة ضبابية وتمثل الخلايا اللمفاوية المفصولة .

- اجريت عملية غسل الخلايا اللمفاوية بأستخدام لثلاث مرات متتالية [10].

2- عد الخلايا اللمفاوية Counting Lymphocytes:

تم تثبيت عدد الخلايا اللمفاوية (1×10^6) خلية /سم^3[11].

3 - بعد ان تم الوصول الى التركيز (1×10^6 خلية /سم^3) ،علقت الخلايا اللمفاوية بشكل نهائي في وسط زرعي مائي خاص (RPMI-1640 media) المجهزه من قبل شركة Invitrogen الأمريكية ،بالأضافة الى ذلك تم اضافة كل من المضاد الحيوي Penicillin وStreptomycine بتركيز (100 مايكروليتر /سم^3) الى المزرعة الخلوية كما اضيف اليها مصل انسان (AB^+) بنسبة (5-10%)، تم تحضير مجموعة تخافيف قياسية للأنسولين (5،10،15،20 mcU/ml) ومن ثم اختبرت قابليتها على احداث التحفيز للخلايا اللمفاوية التائية ، وا عتمد التركيز (20)mcU/ml وذلك لانه اعطى اعلى نسبة تحول للخلايا اللمفاوية التائية الى خلايا ارومية (Blast cell)في المزرعة الخلوية بعد انتهاء فترة التحضين[10].

حضنت المزارع الخلوية عند (37م°) لمدة (72) ساعة ،مع مراعاة تحضير انبوبين لكل مريض الاول يضم المزرعة الخلوية بكل محتوياتها مع اضافة الانسولين والانبوب الثاني يحوي المزرعة الخلوية بكل محتوياتها ولكن بدون اضافة الأنسولين للمقارنة بالأضافة الى عينة السيطرة والتي ضمت (10) اشخاص معافين .

قراءة النتائج

بعد انتهاء فترة التحضين اخذت المزارع الخلوية بعناية لتحضير مسحات رقيقة ومتجانسة ،ثم صبغت المسحة بصبغة لشمان (1.5-2 دقيقة) ثم خففت الصبغة بأستخدام محلول الفوسفات المنظم لمدة (8 دقائق) ثم غسلت الشريحة بالماء الاعتيادي وتركت لتجف ،وتم فحص(200 خلية لمفاوية) لكل شريحة لملاحظة الخلايا اللمفاوية الانفجارية Blast cell ،والتي تظهر كبيرة الحجم وذات نواة كبيرة وسايتوبلازم كثير مقارنة بالخلايا اللمفاوية التي لم تستجيب للأنسولين.

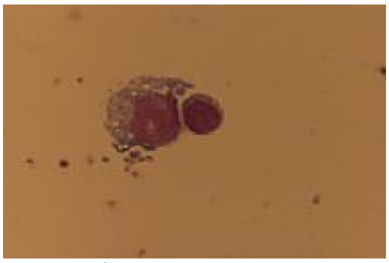
الحسابات Calculation

لتقديرالاعداد المطلقة للخلايا اللمفاوية التي استجابت للتحفيز بواسطة (الانسولين) في (1سم^3) ،تم اجراء تقدير لاعداد الخلايا البيضاء في (1سم^3) واجراء العد التمييزي لكريات الدم البيضاء لكل مريض خضع للتجربة[10].

التحليل الاحصائي : استخدم برنامج (SPSS-18) في تحليل النتائج احصائياً وايجاد قيمة الفروقات المعنوية وذلك باستخدام فحص – T(T-test) تحت مستوى معنوية 0.05

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج الدراسة وجود ارتفاع معنوي عند مستوى معنوية ($p\leq0.05$) في اعداد الخلايا اللمفاوية التائية المتحولة ارومياً بأستخدام الانسولين لمرضى داء السكر وعينة السيطرة كما هو موضح بالجدول (1)،لوحظ ارتفاع معنوي في اعداد الخلايا اللمفاوية التائية المتحولة ارومياً بأستخدام الانسولين لمرضى داء السكر النمط الاول مقارنة بعينة السيطرة ($p\leq0.05$) ،اما في مرضى النمط الثاني فلم يلاحظ وجود فرق معنوي ($p\leq0.05$) في اعداد هذه الخلايا مقارنة بعينة السيطرة كما هو موضح بالجدول (2)، الصورة رقم (1) تمثل الخلايا اللمفاوية التائية المتحولة ارومياً والتي تبدو كخلايا كبيرة الحجم والتي تتمثل بزيادة في حجم النواة والسايتوبلازم مقارنة بالسيطرة.



الصورة (1) الخلايا اللمفاويةالمتحولة ارومياً مقارنة بعينة السيطرة

جدول(1) المقارنة بين اعداد الخلايا الارومية المحفزة بالأنسولين لدى مرضى داء السكر وعينة السيطرة

cell/cm^3	Subject	No.	Mean	± S.D.	p≤0.05
Lymphocytes	Diabetic Patients Control	10 10	74 00	±69.5 ±0.0	S

جدول(2) المقارنة بين اعداد الخلايا الارومية المحفزة بالانسولين لدى مرضى داء السكر النمط الاول والثاني وعينة السيطرة

cell/cm^3	Subject	No.	Mean	± S.D.	p≤0.05
Lymphocytes	IDDM NIDDM Control	5 5 10	119 28 00	±42.1 ±62.6 ±0.0	S NS

يعد الانسولين احد اهم نواتج خلايا بيتا β-cell المتواجدة في غدة البنكرياس ،حيث يصنف بكونه المستضد الذاتي الاول الذي يتكون لدى مرضى داء السكر [12]،ولوحظ من خلال مجموعة من الدراسات التي تناولت استخدام الانسولين (Insulin) او البروانسولين (Proinsulin) اوالمحددات المستضدية الخاصة بهما كلقاح لمنع تطورالأصابة بداء السكر لدى الاشخاص الذين لديهم استعداد وراثي وذلك عن طريق اعطاء جرعات عن طريق الفم منتظمة للفئران NOD ،حيث لوحظ ان هذه الجرعات تحمي الفئران من تطور الداء ،كما اظهرت دراسات لاحقة اخرى ان هذه الجرعات تحفز الخلايا التائية المنظمة المساعدة (CD4$^+$ regulatory T-cells) والتي تحمي الفئران المستعدة للأصابة بداء السكر (Pre-diabetic mice) من تطور الداء [13]. يعتقد بأن الزيادة في اعداد في اعداد الخلايا التائية المساعدة Th2 قد يعتمد على قدرة الانسولين على تحريك حالة ضد العوامل الألتهابية(anti-Inflammatory state) لدى مرضى داء السكر وفي النهاية يقود ذلك الى كبح لفعالية الخلايا التائية السامة [14]،لقد فشل استخدام الانسولين كلقاح لدى المرضى المصابين فعلياً بداء السكر،في حين استخدمت الاجسام المضادة للأنسولين (IAAs) كمعايير لتقدير تطور مراحل داء السكر لدى اولئك المرضى [15].

من ناحية اخرى ومن خلال در اسة المستقبلات الخاصة بالانسولين على سطح الخلايا التائية ،فقد لوحظ ان مستقبلات الانسولين تظهر فقط في حالة تحفيز الخلايا التائية والدخول في طور الانقسام والتكاثرلدى الاشخاص الاعتياديين ،حيث اظهرت دراسة الباحث [16] بأن الأستجابة لظاهرة الانجذاب الكيميائي(Chemotactic) تزداد عند الخلايا التائية والمحفزة بمادة PHA مقارنة بالخلايا غير المحفزة بمادة PHA .

ولوحظ عند استخدام الانسولين خارج الجسم(in vitro) لتحفيز الخلايا اللمفاوية التائية في حالة الراحة Resting T cells (Negative cooperativity) تعطي اشارات خلوية تعمل على تحطيم جزيئات الانسولين ،ثم تنشأ بعد ذلك مستقبلات لجزيئات الانسولين على سطح تلك الخلايا ،اما بالنسبة للخلايا المتحولة (receptor positive lymphoblasts) فيحدث انخفاض في تنظيم مستقبلات الانسولين على سطح تلك الخلايا ،وهذا الاكتشاف يشير الى ان تركيز مستقبلات الانسولين لدى الخلايا المتحولة ارومياُ لايتأثر بوساطة الانسولين وتنتظم هذه المستقبلات من خلال ظهورها تباعاً على سطح الخلية لدى الاشخاص الاعتياديين[17] .

ومن دراستنا الحالية لوجظ ان الخلايا اللمفاوية التائية لدى مرضى داء السكر النمط الاول تحولت ارومياً بعد تعرضها للانسولين من مصادره الخارجية (exogenous autoantigen) ومن دون تحفيز تلك الخلايا بمادة PHA ،وهذا يفسر بأن الخلايا التائية لمرضى داء السكر قد تعرفت مسبقاً على الانسولين بصفه مستضد ذاتي لذلك اظهرت التحول الارومي من دون الاعتماد على التحفيزبمادة PHA ،كما اظهرت نتائج دراستنا الحالية ان جميع مرضى داء السكر النمط الاول اظهروا نتائج موجبة للتحول الارومي بأستخدام الانسولين اما في حالة مرضى داء السكر النمط الثاني فقد لوحظ ان واحد من مجموع خمس مرضى اظهر تحول ارومي للخلايا اللمفاوية التائية باستخدام الانسولين كمحفز لتلك الخلايا ويعود السبب الى ان الخلايا التائية لدى مرضى داء السكر النمط الثاني لاتستجيب للأنسولين بصفته المستضدية الذاتية ولذلك تحتاج تلك الخلايا الى مستقبلات سطحية خاصة بألانسولين تظهر على سطحها و الى مادة تحفز الخلايا على التحول الارومي مثلPHA وغيرها كما الحال لدى الأشخاص الاعتياديين ،اما بالنسبة للحالة التي اظهر تحولاً ارومياً في النمط الثاني ،فيفسر بكون هذه الحالة اصابة بداء السكرولكن من نوع(LADA)Latent Autoimmune Diabetes of adults والذي يعد الانسولين فيه كمستضد ذاتي كما هو الحال في النمط الاول وربما فيما بعد قد يستخدم الانسولين في العلاج وذلك لفشل خلايا بيتا (β-cells) في انتاج الانسولين بشكل كامل .

وفي متابعة لدراسة الباحث [18] والتي ذكر فيها ارتباط فعالية الخلايا التائية بتأثيرها المباشر على خلايا بيتا (β-cells) المتواجدة في البنكرياس ويعتقد بأن لها دور فعال في تطور المرض المناعي الذاتي (داء السكر النمط الاول)، ولكن ولحد الان لم يتم تشخيص الهدف

الجزيئي (molecular targets)الذي تستهدفه الخلايا التائية لدى خلايا(β-cells)،حيث استطاع الباحث وزملاءه من تشخيص مستضد سطحي عند موقع ارتباط كلونات او نسل الخلايا التائية الفعالة وخلايا جزر لانكرهانز لدى المرضى المصابين حديثاً بداء السكر ،ومن خلال تقنيات (Subcellular fractionation) والتي استخدمت فيها الفئران المحث فيها الورم الجزيري (Insulinoma)،اظهرت النتائج تمييز كلونات الخلايا التائية لمحدد مستضدي مندمج مع مكونات جدار الحبيبات المنتجة للأنسولين وبعد اجراء عمليات التنقية (Purification) تم تشخيص مستضد (Monomer) واحد .

ان التفاعل المناعي الذاتي والذي من شأنه تحطيم خلايا بيتا β-cells لدى مرضى داء السكر النمط الاول تستهدف الانسولين (Insulin) او البروالانسولين، ان الخلايا التائية التي تميز المنطقة (A-chain) لجزيئة الانسولين لوحظ وجودها في العقد اللمفاوية المحيطة بالبنكرياس لدى مرضى داء السكر النمط الاول، وللبحث والتحري عن وجود خلايا تائية متخصصة (T-cells) توجه استجابة ضد (Proinsulin) تم جمع نسل اوكلونات الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة $CD4^+$ من شخص متبرع ومصاب بالنمط الاول من داء السكر .ان مستضدات التوافق النسيجي HLA-DR4 تكون مقيدة بالمحددات المستضدية التي تحملها والتي تتمثل بأول 13 حامض اميني لجزيئة (A-chain) الخاصة بالأنسولين (A1-13)،ان تمييز الخلايا التائية T-cells يعتمد على حدوث تغيير او اعادة تشكيل للببتيدات المتواجدة قرب اصرة الكبريت بين بقايا السستين المتجاورة عند الموقع (A6-7) ،ان هذا التغيير او اعادة التشكيل لايؤثر على ارتباط ببتيدات الانسولين مع مستضدات التوافق النسيجي HLA-DR4 ، بالأضافة الى ذلك عزلت كلونات الخلايا التائية المساعدة $CD4^+$ T-cell والتي تمييز هذه المحددات المستضدية من الاطفال الحاملين(HLA-DR4)،كما لوحظ وجود اجسام مضادة ذاتية للأنسولين في مصول اولئك الاطفال مما يجعلهم اكثر عرضه لتطور داء السكرالنمط الاول [19].

من خلال الدراسة التي اجراها Mohan واخرون عام 2010 والتي تناولت تطور وظهور داء السكر لدى الاشخاص الذين لديهم استعداد وراثي،حيث اشار الباحث الى وجود اكثرمن عامل لتطور المرض المناعي الذاتي الذي يصيب الانسجة المتخصصة ،واهم هذه العوامل هو وجود تفاعل ذاتي لخلايا T-cells والذي يستدعي ارتشاح الخلايا اللمفاوية من الانتخاب الثايموسي السالب (Thymic negative selection) ،اما العامل الثاني يستدعي توفر الظروف المناسبة لتقديم المستضدات الذاتية(autoantigens) وتحفيزها عند النسيج الهدف .ان مجموعة الخلايا التائية المساعدة $CD4^+$ المتخصصة لببتيدات الأنسولين لاتميز بروتينات الانسولين عندما تعالج وتقدم من قبل الخلايا العارضة للمستضدات (APCs)،ولكن الخلايا الهاربة من سيطرة الغدة الثايموسية تشارك في تطور داء السكر ،بالأضافة الى ذلك فأن الخلايا العارضة للمستضدات تكون في حالة تلامس شديد (close contact) مع خلايا بيتا (β-cells)المتواجدة في جزر لانكرهانز والتي تفرز الانسولين من الحويصلات الخاصة بأنتاج الأنسولين والذي يحمل الصفة المستضدية ويحفز استجابة المناعية للخلايا التائية [20].

وفي دراسة للخلايا وحيدة النواة (PBMCs) والمأخوذة من اطفال مشخصين بأصابتهم بداء السكر النمط الاول قبل وبعد بدء العلاج بالأنسولين، ومتابعة التاثيرات الخلوية نتيجة التحفيز بالانسولين (الأنسان والابقار) ولمدة (72) ساعة على الخلايا التائية المنظمة (Regulatory T-cells) (وهو نفس الزمن المقترح ضمن الدراسة الحالية مع فرق استخدام الانسولين الخاص بالانسان فقط)، اظهرت نتيجة الباحث Tiittanen وزملاءه وجود زيادة في التعبير لكل من mRNA(ICOS، CTLA-4،Foxp3) لدى خلايا (PBMCs) لمرضى داء السكر النمط الاول الخاضعين للعلاج مقارنة بالمرضى غير الخاضعين للعلاج وهذا يفسر التحول الارومي للخلايا اللمفاوية لدى مرضى داء السكر النمط الاول بعد التحفيز بالانسولين ضمن الدراسة الحالية ،كما تتفق دراستنا الحالية مع دراسة Tiittanen بأن العلاج بألانسولين يحفز الخلايا التائية المنظمة والمتخصصة بالأنسولين (Insulin-specific regulatory T-cells)، ان تأثيرات التحفيز بوساطة استخدام الانسولين من مصادره الخارجية (exogenous autoantigen) قد تفشل في الكشف عن التغييرات الحاصلة للخلايا PBMCs لدى الاطفال المصابين حديثاً بداء السكر ،وقد يستطيع المستضد الذاتي من تحفيز الخلايا التائية المنظمة والتي ربما تساهم في التخلص من الاصابة بداء السكر[21] .

المصادر

1. Palmer, J. P.; Asplin , C. M.; clemous, P.; Lyen; K.; Tatpah; O.; Raghu, P. K.; and paquette, T. (1983) Insulin antibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment. Science 23:133-7-1339.

2. Potter, N. K. and Wilkin, T. J.(2000): The molecular specificity of insulin autoantibodies. Diabetes Metab. Res Rev 16: 338-353.

3. Fineberg,S.E.;Kawabata, T. T.;Finco-Kent, D.; Fountaine, R. J. Finch, G.L.,Krasner,A.S.(2007) Imunological responses to exogenous insulin .Endocr Rev. 28.(6):625-52.

4. Wagmann, D.R.; Simone,E.A.;Eisenbarth, G.S.(1997)T-cell receptor gene polymorphism assiociated with anti- Insulin, autoimmune T-cells in diabetes prone NO Dmice. J. Autoimmun.10:317-321.

5. Daniel, D.; Gill, R. G.; Schloot, N; Wegmann, D. (1995) Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. Eur J Immunol, 25:1056-1062.

6. Wong, F.S.; Karttunen, J.; Dumont, C; Wen,L.; Visintin,I; Pilip, I.M.; Shstri, N.; Pamer, E.G.; Janeway, C.A.J.(1999) Identiification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library: Nat Med .5:1026-1031.

7. Trudeau,J.D.; Kelly-Smith,C.; Verchere, C.B.; Elliott, J.F.; Dutz, J.P.; Finegood, D.T.; Santamaria, P.; Tan, R. (2003) prediction of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by quantification of autoreactive T-cells in peripheral blood.J Clin.Invest.111:217-223

8. Lewis, S. M. and Bain, B. J. (2001) Dacie and Lewis Practical Haematology Harcount publishers limited; 9th Edition PP. 320.

9. Mckenzie, S. B. (1996) textbook of haematlolgy. 2ed ed., Williams and Wilkins. A Waverly company U.S. A. pp. 605-607

10. Al-Shahery M., (1974) Etude de li'teruention de l'immunite' humorale et cellulaire dans les maladies auto-immunes thyroidiennes Msc Thesis Universite De NANcy I. France.

11. Jennifer, Chong S. W. (2006) Determining cell number and viability with Haemocgtometer and trypan blue staining. National University of Singapore Dep. Of orthopaedic surgery. On line protocols. Version 1. Protocol no=A5

12. Zhang, J. ; Davidson, L.; Eisenbarth, G.; Weiner, H. L. (1991) Suppression of diabetes in non-obese diabetic mice by oral administration of procine insulin. Proc Natl Acad. Sci U. S. A. 88(22): 10252-10256.

13. Bergerot, I.; Fabien, N.; Maguer, V.; Thivolet, C. (1994) Oral Administration of Human Insulin to NOD Mice Generates CD4+ T Cells that Suppress Adoptive Transfer of Diabetes. J. Autoimmune 7(5): 655-663

14. Odumosu, O.; Payne, K.; Baez, I.; Jutzy, J. (2011) Suppression of dendritic cell activation by diabetes autoantigens linked to the cholera toxin B subunit. J Immunobiology 216(4):447-456.

15. Pozzilli, P. (2002) The DPT-1 trial: a negative result with lessons for future type 1 diabetes. Diabetes Metab Res Rev. 18(4):257-9.

16. Berman, J. S. and Center, D. M. (1987) Chemotactic activity of porcine insulin for human T lymphocytes in vitro. J. Immunology Vol 138. 7: 2100-2103.

17. Brown, T. J.; Ercolani, L. and Ginsberg, B. H. (1983) Properties and regulation of the T lymphocyte insulin receptor. Veterans Administration medical center, lowa city. Vol. 3, No.4 pp. 481-494.

18. Roep, B. O.; Arden, S. D.; De- vrie, R. R. P.; Hutton, J. C. (1990) T-cell clones from a type-1 diabetes patient respond to insulin secretory granule proteins. Nature 345, 632-634.

19. Mannering, S. I.; Harrison, L. C.; Williamson, N. A.; Morris, J. S.; Thearle, D. J.; Jensen, K. P.; Key, T. W.; Rossjohn, J.; Falk, B. A.; Nepom, G. T.; Purcell, A. W. (2005). The insulin A-chain epitope recognized by human T cells is posttranslationally modified JEM vol. 202 no. 9 PP. 1191-1197

20. Mohan, J. F.; Levisetti, M. G.; Calderon, B.; Herzog, J. W.; Petzold, S. J.; Unanue, E. R. (2010) Unique autoreactive T cells recognize insulin peptides generated within the islets of Langerhans . J immunology vol 11 pp. 350-354.

21. Tiittanen, M.; Huupponen, J. T. ; Knip, M.: Maarala; O.(2006) Insulin treatment in patients with type 1 diabetes induces upregulation of regulatory T-cell markers in peripheral blood mononuclear cells stimulated with insulin in vitro. Diabetes 55 (12): 3446-54.

Lymphoblast Transformation test by using insulin as antigen

Rojan G.M.A. Al-allaf [1], Mohamed, A.N. Al-Shahery[2]

(Received: 29 / 12 / 2011 ---- Accepted: 8 / 5 / 2012)

Abstract

The study includes using exogenous insulin for stimulated T-lymphocytes isolated from peripheral blood for lymphoblast transformation test in (10) Diabetic patients,(5) of them Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) and others Non- Insulin Dependent Diabetes Mellitus NIDDM,compared with (10) healthy person as control.the results indicated lymphoblast transformation for lymphocytes which is an isolated from IDDM patients,and one patient with NIDDM ,the others with NIDDM didn't response to exogenous insulin.