Faculty of Medicine
Ain Shams University

Lymphocyte Apoptosis in Type ١ Diabetes Mellitus

Thesis

Submitted for partial fulfillment
of Master Degree in Pediatrics

By

Ali Ahmed Ali Wahbah

M.B.B.Ch,Faculty of Medicine ,Tanta University

Under Supervision of

Prof. Dr./ Eman Monir Sherif

Professor of Pediatrics
Faculty of Medicine ,Ain Shams University

Prof. Dr./ Hala Gharieb Mohamed

Professor of Clinical Pathology
Faculty of Medicine ,Ain Shams University

Dr. Amira Abd El Monem Adly

Lecturer of Pediatrics
Faculty of Medicine ,Ain Shams University

Faculty of Medicine
Ain Shams University
٢٠٠٧

Lymphocyte Apoptosis In Type ١ Diabetes Mellitus

Thesis

Submitted for partial fulfillment
of Master Degree in Pediatrics

By

Ali Ahmed Ali Wahbah

M.B.B.Ch,Faculty of Medicine ,Tanta University

Under Supervision of

Prof. Dr./ Eman Monir Sherif

Professor of Pediatrics
Faculty of Medicine ,Ain Shams University

Prof. Dr./ Hala Gharieb Mohamed

Professor of Clinical Pathology
Faculty of Medicine ,Ain Shams University

Dr. Amira Abd El Monem Adly

Lecturer of Pediatrics
Faculty of Medicine ,Ain Shams University

Faculty of Medicine
Ain Shams University

٢٠٠٧

Protocol

Introduction:

Type ١ diabetes mellitus (DM١) is the effect of T cells dependant autoimmune destruction of insulin producing beta cells in the pancreatic islets.Tcells are activated in response to islet dominant autoantigens, the result being the development of diabetes mellitus type ١.Insulin is one of the islet autoantigens responsible for activation of T lymphocyte functions, inflammatory cytokines production and development of diabetes mellitus type ١. ***(Tchorzewski et al., ٢٠٠١)***

Apoptosis is an active form of cellular self-destruction that plays an essential role in tissue homeostasis, in embryonic development, and in the control of immune responses in adult (***Holmstorm and Eriksson ٢٠٠٠***)

A high proportion of apoptotic lymphocytes in diabetic states may explain the impaired immune function in poorly controlled diabetic patients. ***(Otton et al., ٢٠٠٤)***

Lymphocyte apoptosis plays an important role in proper immune function ***(Porter and Malek ١٩٩٩)***. It removes developing lymphocytes that fails to express an antigen receptor; thereby ensuring a functional repertoire of mature B and T cells, and it maintains tolerance toward self by eliminating lymphocytes with antigen receptors that recognize autoantigens. Apoptosis also regulate the size and duration of immune

responses. Activated lymphocytes are killed when an infection is cleared successfully ***(Newton and Strasser ۲۰۰۱).***

The decreased percentage of CD۳ lymphocyts in the peripheral blood of patients with a high risk of diabetes mellitus type ۱ is suggestive of the involvement of T cells in the local immune reactions.***(Mauricio and Mandrup. ۱۹۹۸)***.

Fas (Apo-١/ CD٩٥) is a ٤٥-KDa surface receptor belonging to the nerve growth factor superfamily, which on binding by Fas ligand (FasL) induces translocation of phosphatidylserine from the inner to the outer leaflet of the cellular membrane ***(Pelassy et al., ۲۰۰۰)*** and directly transduces the signal for programmed cell death (apoptosis). ***(Chervonsky et al., ۱۹۹۷)*** thus playing a significant role in the pathogenesis of autoimmune diabetes ***(Kristan et al., ۲۰۰۰).***

Aim of the Work:

The aim of this study is to assess the lymphocyte apoptosis with CD٩٥ antibodies to demonstrate activation induced cell death in children with high risk of type ١ diabetes mellitus and in type ١ diabetic children under insulin therapy.

Patients and methods:

The study will include ٣٥ children and adolescents. They will be divided into three groups:

Group I) Will include ١٥ children with type ١ diabetes mellitus.They will be recruited at random from the regular attendants of the Pediatric Diabetes Clinic,Children Hospital,Ain Shams University.

Iclusion criteria:

-Disease duration > ١ year

-Regular insulin therapy

Group II): Will include ١٠ children with high risk of type١diabetes mellitus (prediabetics),and will be selected based on the following criteria.

١-First degree relatives of type ١diabetes mellitus.

٢- No clinical signs of the disease.

٣-Normal fasting blood glucose level

٤- Positive First Phase Insulin Release.(FPIR), and or positive (ICA) and (GAD) antibodies.

Group III) Will include ١٠ healthy children with comparable age and sex with no clinical or laboratory signs of type ١diabetes mellitus and with no family history of diabetes in their first or second degree relatives. .

Methods:

All patients and controls will be subjected to the following:

١-History taking:

A structured questionnaire will be planned to fulfill the following data:

- Demographic data; name, age, sex, socioeconomic class.
- Age at onset of DM,disease duration for group ١
- Insulin therapy; regarding type, dose and frequency for group ١.
- History suggestive of acute metabolic complications:-

١. History suggestive of hypoglycemic attacks (sweating, headache, blurring) and files will be revised for the number of hospital admissions due to these attacks during the last two years prior to study.

٢. History suggestive of hyperglycemia (polyuria, polydipsia, coma due to DKA). And files will be revised for number of hospital admissions due to DKA in the last two years prior to the study.

- History suggestive of chronic diabetic complications:-
  - Ocular manifestations; blurring of vision, flashs of light.

- CVS manifestations; palpitations, chest pain, postural hypotension.
- Renal complications; polyuria, loin pain.-
- Peripheral neuropathy; tingling, numbness, parasthesia, impaired or lost sensation.

Files will be revised for the presence of hypertension, microalbumenuria and diabetic retinopathy.

٢-Clinical Examination:

Through clinical examination with particular emphasis on:

- Anthropometric measures:
  ١. Weight in Kg.
  ٢. Height in Cm.

  and values will be plotted against percentiles for age and sex according to Egyptian growth charts.
- Body mass index.
- Sexual maturity rating.
- Local abdominal examination.
- Full neurological examination.

٣-Laboratory investigations:

- Mean random blood suger (MRBS): using glucocard blood glucose monitoring system supplied by ARKRAY.Inc.
- Glycosylated hemoglobin (HbA١C): using quantitative calorimetric determination of glycohemoglobin in whole blood.

- For microvascular complications:-
  Fundus examination using direct ophthalmoscope for diabetic retinopathy.
- Quantitative determination of urinary microalbumin of urinary microalbumin for diabetic nephropathy.Microalbuminuria was defined as excretion rate of albumin ٣٠-٣٠٠ mg/urinary creatinine.
- Flow cytometry Assessment of : -

  -CD٣, and **CD٩٥** expression for detection of apoptosis.

References

Chervonski, Wang, Wong, Visitin, Flawell, Janeway, et al., (١٩٩٧). The role of Fas in autoimmune diabetes, Cell. ٨٩ ١٧-٢٤.

Holmstorm TH, Eriksson JE(٢٠٠٠): phosphorylation-based signaling in Fas receptor-mediated apoptosis. Critical reviews in immunology ٢٠ ١٢١-١٥٢.

Kristan, Costa, Shen, Gero, et al., (٢٠٠٠).Significant role for Fas in the pathogenesis autoimmune diabetes,J. Immunol.,١٦٤.

Mauricio ,Mandrup-Poulsen(١٩٩٨), Apotosis and the pathogenesis of IDDM.Diabetes ٤٧ ١٥٣٧-١٥٤٣.

Newton K.Strasser(٢٠٠١): Acell death control in lymphocytes.Advances in immunology ٧٦ ١٧٩-٢٢٦.

Otton R, Soriano FG, Verleengia R, Curi R(٢٠٠٤): Diabetes induces lymphocyte apoptosis.J Endocrinal.١٨٢(١):١٤٥-٥٦.

Pelassy, Breittmayer,Aussel(٢٠٠٠),Regulation of phosphatidylserine exposure at the cell surface by the serine-base exchange enzyme system during CD٩٥-induced apoptosis,Biochem. Pharmacol.٥٩ ٨٥٥-٨٦٣.

Porter BO,Malek TR(١٩٩٩):Prostaglandin E٢ inhibits T cell activation-induced apoptosis and Fas-mediated cellular cytotoxicity by blockade of Fas-ligand induction.European journal of immunology ٢٩ ٢٣٦٠-٢٣٦٥.

***Tchorzewski H, Glowacka E, Banasik M, Lewkoicz P, Szalapska-Zawodniak M.(٢٠٠١)*:** Activated **T** lymphocytes from patients with high risk of type ١ diabetes mellitus have different ability to produce interferon-gamma,interleukin-٦ and interleukin-١٠ and undergo anti-CD٩٥ induced apoptosis afer insulin stimulation.Immunol Lett;١٥;٧٥(٣):٢٢٥-٣٤.

مقدمـــــه

- مرض البول السكري النوع الأول هو نتيجة التكسير الذاتي لخلايا (البيتا) المنتجه للأنسولين في جزر النبقراس . خلايا (T) تحفز عن طريق مستنفرات ذاتية لجزر البنقراس وتكون النتيجة حدوث مرض البول السكري النوع الأول . إن الأنسولين هو واحد من المستنفرات الذاتية بجزر البقراس المسؤله عن تحفيز الخلية اللمفيه (تى) وتكون الحركة الدفاعية وحدوث مرض البول السكري النوع الأول .

- إن التدمير الذاتي للخلية يلعب دور مهم في استقرار الانسجه وفى نمو الاجنه وأيضا في التحكم في رد الفعل المناعي للبالغين

- إن النسبة الكبيرة من التدمير الذاتي للخلايا اللمفيه في حالات مرض السكر البولي توضح قصور الوظيفة المناعية للحالات التي لديها مشاكل في ضبط نسبه السكر

- إن التدمير الذاتي للخلية اللمفيه يلعب دورا مهما في الجهاز المناعي . لأنه يساعد في التخلص من الخلايا المفيه التي تفشل في إظهار مستقبلات الانتيجن ومن ثم الحفاظ على التوازن عن طريق أزاله الخلايا اللمفيه التي تحتوى على مستقبلات الانتيجن التي تتعرف على الانتيجينات الذاتية . للخلية (ايو بتوزيز) ينظم حجم ومده رد الفعل المناعي . إن الخلايا المفيه المنشطة تقتل عندما يزول الالتهاب بنجاح

- إن نقص نسبه الخلايا اللمفيه نوع CD٣ في الدم للمرضى المعرضين لمرض السكر البولي النوع الأول ينوه عن انضمام الخلية اللمفيه (تى) في التفاعلات المناعية المحلية.

- CD٩٥ عبارة عن مستقبل سطحي من نوع (KDa_ ٤٥) ينتمي إلى عائله عامل النمو العصبي وهو عند ارتباطه ب فاس ال (fasl) يحفز نقل السيرين الفسفوري من داخل إلى خارج الغشاء الخلوي . وحينئذ يكون إشارات التدمير الذاتي للخلية ومن هنا يلعب دورا مهما في أمراض المناعة الذاتية في مرض السكر البولي

هدف الدارسه :

إن الهدف من هذه الدر اسه هو تقيم التحلل الذاتي للخلايا المفيه باستخدام مضادات CD٩٥ لكي توضع التحلل المنشط للخلايا في الأطفال المعرضين لحدوث مرض السكر البولي والمرضى الذين يعانون من مرض السكر البولي النوع الأول .

المرضى والطريقة

إن هذه الدر اسه تتضمن ٣٥ طفل وهذه المجموعة سوف تقسم إلى ٣ مجموعات

المجموعة الأولى

سوف تتضمن ١٥ طفل مصابين بي مرض السكر النوع الأول سوف يتم اختيارهم عشوائي من المترديين المنتظمين على عيادة مرضى سكر الأطفال في مستشفى الأطفال . جامعه عين شمس مع هذه الشروط :

- مده المرض اكبر من سنه
- يتعاطوا الأنسولين بانتظام

المجوعة الثانية

سوف تتضمن ١٠ أطفال معرضين لحدوث مرض السكر البولي وسوف يتم اختيارهم على هذه الأسس:

١- أن يكونوا أقارب من الدرجة الأولى لمرضى السكر البولي النوع الأول .

٢- ليس هناك اى علامات اكلنيكيه للمرض .

٣- تحليل سكر الدم الصائم طبيعي .

٤- المرحلة الأولى من إفراز الأنسولين (ايجابي) .

المجموعة الثالثة

سوف تتضمن ١٠ أطفال أصحاء مع سن مناسب و ليس هناك اى علامات إكلنيكيه أو معمليه لمرضى السكر البولي النوع الأول وليس هناك تاريخ عائلي لمرض السكر البولي في الأقارب من الدرجة الأولى أو الثانية

الطريقة

كل المرضى والأصحاء سوف يعرضون للأتي :-

* اخذ التاريخ المرضى .

والأسئله سوف تتضمن الاتى.

١- الاسم , السن ,السكن , النوع , الحالة الاجتماعية .

٢- العمر الذي حدث فيه مرض السكر البولي ,وعمر المرض بالنسبة للمجموعة الأولى

٣- العلاج بي الأنسولين نوعه , والجرعة , بالنسبة للمجموعة الأولى