جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

تأثير العلاج بانواع مختلفة من الانسولين على الإستجابة المناعية والتعبير الجيني للجين FoxP3 لمرضى السكر النمط الاول في مدينة الموصل

سعد امرير علي عبدالله الجبوري

رسالة ماجستير

علوم الحياة / أحياء مجهرية

بإشراف

الأستاذ المساعد
د. روجان غانم محمد أيوب العلاف

1444 هـ 2023 م

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية إلى متابعة تأثير أنواع الأنسولين الخارجي في السيطرة على مستوى الكلوكوز ومدى تأثر الاستجابات المناعية الخلوية والخلطية بالمعالجة لدى مرضى داء السكر النمط الأول، فضلاً عن تقدير مستوى التعبير الجيني للجين Forkhead box P3 (*FoxP3*) احد اهم الجينات المسؤولة عن فعالية الخلايا المنظمة Regulatory T cells لدى مرضى داء السكر النمط الأول.

تضمنت الدراسة (٨٠) عينة دم لمرضى مشخصين بإصابتهم بداء السكر النمط الأول لمدة من (٣-٥) سنوات، تراوحت أعمارهم بين (١٥- ٣٥) سنة، ومن كلا الجنسين من مراجعين مركز الوفاء لمعالجة مرضى السكر والغدد الصم في مدينة الموصل(خلال المدة من ٢٦-١٠-٢٠٢١ إلى ١٣-٢-٢٠٢٢)، تم تقسيم المرضى إلى أربع مجاميع اعتماداً على نوع الأنسولين المستعمل للسيطرة على مستوى الكلوكوز تضمنت هذه المجاميع المرضى المستعملين كل من الأنسولين نوع (الصافي Actrapid، الخابط Insulatard، الصافي والخابط Actrapid/Insulatard ، واخيراً المزيج Mixtard)، وتضمنت مجموعة السيطرة (٢٥) عينة دم لأشخاص أصحاء (ذكور وإناث) غير مصابين بأمراض انتقالية اوعدوى جرثومية أو أمراض المناعة الذاتية.

تضمنت الدراسة ثلاثة محاور، اعتمد المحور الأول (المحور المناعي) على متابعة تأثير أنواع الأنسولين ضمن مجاميع الدراسة الأربعة على بعض المقاييس المناعية الخلوية والخلطية منها الأعداد الكلية لخلايا الدم البيضاء، الأعداد المطلقة للخلايا العدلة، اللمفاوية، الوحيدة النواة، الحمضة، الخلايا البلعمية فضلاً عن تقدير تركيز البروتين الكلي، الألبومين واخيراً الكلوبيولين. أظهرت نتائج المحور المناعي وجود فروقات معنوية في معدل الأعداد الكلية لخلايا الدم البيضاء، والأعداد المطلقة للخلايا العدلة، اللمفاوية، الوحيدة النواة، الحمضة، الخلايا البلعمية، ومستوى الكلوبيولين، والبروتين الكلي، الألبومين لدى بعض من مجاميع الدراسة عند مقارنتها مع بعضها فضلاً عن عينة السيطرة عند ($P\leq0.05$).

تضمن المحور الثاني (الجزيئي) قياس مستوى التعبير الجيني للجين *FoxP3*، إذ تم انتخاب (٢٦) مريض من مجموعة الدراسة الكلية والتي ضمت (٨٠) مريضاً، تميز هؤلاء المرضى بسيطرتهم على مستوى الكلوكوز في الدم ضمن حدود ثابتة تراوحت بين(١١٠ -١٩٠ mg/dl) ولمدد طويلة، ومؤشر كتلة الجسم Body Mass Index لديهم تراوح بين (٢٠-٢٣)، وباستعمال تقنية qPCR quantitative polymerase chain reaction، أظهرت نتائج اختبار دنكن لأزواج المقارنات واختبار مستوى المعنوية وجود ارتفاع معنوي في مستوى التعبير الجيني للجين *FoxP3* لمجاميع الدراسة الأربع مع بعضها البعض فضلاً عن عينة السيطرة عند ($P\leq0.05$) ، حيث اظهر

مجموعة مرضى الخابط اعلى تعبير جيني في حين كان مجموعة مرضى الصافي والخابط اقل تعبيرفي مستوى التعبير الجيني للجين *FoxP3*

اعتماداً على نتائج المحور الأول (المناعي) والمحور الثاني (الجزيئي) تم تنظيم المحور الثالث (المناعي – الجزيئي)، وتم إضافة اختبارين إلى هذا المحور، الاختبار الأول تمثل بقياس تركيز الأنسولين الكلي في مصل المرضى ضمن عينة الدراسة، والاختبار الثاني تمثل بقياس تركيز الببتيد –C لاستخراج تركيز الأنسولين المنتج داخل الجسم. أظهرت نتائج قياس تركيز الأنسولين الخارجي عدم وجود فروقات معنوية في تركيز الأنسولين لدى مجاميع الدراسة مقارنة بعينة السيطرة عند ($P\leq0.05$).

وباستعمال برنامج التحليل الإحصائي SPSS.25 تم إجراء اختبار علاقة تحليل الأثر في محاولة لتحديد مدى تأثر مستوى التعبير الجيني للجين *FoxP3* بمستويات الكلوكوز والأنسولين الخارجي، فضلاً عن قياس مدى تأثير مستوى التعبير الجيني المرتفع للجين *FoxP3* على المقاييس المناعية ضمن الدراسة.

أظهرت النتائج عدم وجود علاقة اثر للأنسولين الخارجي على مستوى التعبير الجيني للجين *FoxP3*لمجاميع الدراسة الأربعة، وعلى العكس من ذلك أظهرت النتائج اثر تركيز الكلوكوز في مستوى التعبير الجيني للجين *FoxP3* زيادة بنسبة (٢٦٪) لدى مجموعة المرضى الذين يستخدمون الأنسولين نوع المزيج، في حين أظهرت نتائج تحليل الأثر للكلوكوز على مستوى التعبير الجيني للجين *FoxP3* نسبة (٧٦٪) لدى مجموعة المرضى الذين يستعملون الأنسولين نوع الخابط عند ($P\leq0.05$).

وأظهرت النتائج وجود علاقة اثر لارتفاع مستوى التعبير الجيني للجين*FoxP3* على كل من الأعداد المطلقة للخلايا اللمفاوية، الوحيدة النواة، البلعمية والكلوبيولين بنسبة ٢٠٪،٢٧٪،٢٣٪،٢٥٪ على التوالي لدى مرضى داء السكر الذين يستعملون الأنسولين من نوع (الصافي). واخيراً ظهرت علاقة اثر لارتفاع مستوى التعبير الجيني للجين*FoxP3* على كل من الأعداد المطلقة البلعمية والكلوبيولين بنسبة ٢٠٪،٢٩٪ على التوالي لدى مرضى داء السكر الذين يستخدمون الأنسولين من نوع (الصافي والخابط) عند ($P\leq0.05$).

Abstract

This study aims to follow up the effect of exogenous insulin types in controlling glucose levels and the extent to which cellular and humoral immune responses are affected by the treatment in patients with type 1 diabetes. In addition, it aims to estimate the level of gene expression of the *FoxP3*, which is one of the most important genes responsible for the activity of regulatory T cells in patients with type 1 diabetes mellitus.

The study included 80 blood samples of male and female patients diagnosed with type 1 diabetes for the period of 3–5 years. These patients, who fall in the age range of 15–35 years, visited at the Al-Wafa Center of Diabetics and Endocrinology in Mosul، during 26/10/2021–13/02/2022. The patients were divided into four groups depending on the type of insulin used to control their glucose levels. These groups included patients who used insulin Actrapid, Insulatard, Insulatard/Actrapid or Mixtard. The control group included 25 blood samples of healthy males and females without infectious diseases, bacterial infections, or immune diseases.

The study included three axes. The first axis, the immunological axis, was based on following up the effect of insulin types within the four study groups on some cellular and humoral immunological parameters, including the total numbers of white blood cells, the absolute numbers of neutrophils, lymphocytes, mononuclear cells, eosinophils and phagocytes. In addition to the determination of the concentration of total protein, albumin and globulin. The results of the immunological axis showed that there were significant differences in the rates of total number of white blood cells and the absolute number of neutrophils, lymphocytes, mononuclear cells, eosinophils, phagocytes, globulin, total protein and albumin in some of the study groups when compared to each other and to the control sample at $P \leq 0.05$.

The second axis, the molecular axis, included measuring the level of FoxP3 gene expression in 26 of the 80 patients for long periods. Their body mass index was in the rang of 20–23 . Using quantitative polymerase chain reaction qPCR technology, the results of Duncan's test for comparison pairs showed a significant increase in the level of *FoxP3* gene expression for the four study groups in compared to the control sample at $P \leq 0.05$.

Depending on the results of the first immunological axis and the second molecular axis, the third immunological–molecular axis was organised. Two tests were added to this axis. The first test included measuring the total insulin concentration in the serum of patients within the study sample, and the second test included measuring the concentration of peptide-C to extract the concentration of insulin produced inside the body. The results of measuring the concentration of exogenous insulin showed no significant differences in the concentration of insulin in the study groups compared to the control sample at $P \leq 0.05$.

Using the statistical analysis program SPSS.25, an effect analysis relationship test was conducted to determine the extent to which the level of gene expression of the FoxP3 gene is affected by the levels of glucose and exogenous insulin, in addition to measuring the effect of the high level of gene expression of the FoxP3 gene on the immunological parameters within the study.

The results showed that there was no effect of exogenous insulin on the levels of *FoxP3* gene expression in the four study groups. On the contrary, the results showed an effect of glucose concentration on the levels of the *FoxP3* gene expression in 26% of the group of patients who used insulin Mixtard. Meanwhile, the results of the effect analysis of glucose on the level of gene expression of the *FoxP3* gene showed in 76% of the patients who used the Insulatard insulin at $P \leq 0.05$. The results also showed an effect of high levels of the *FoxP3* gene expression on the absolute numbers of lymphocytes, mononuclear cells, phagocytes, and globulin in 20%, 27%, 23% and 25%, respectively, of diabetic patients who used Actrapid insulin. Finally, there was an effect on the high level of gene expression of the *FoxP3* gene on both phagocyte absolute numbers and globulin in 20% and 29%, respectively, of diabetic patients who used insulin Insulatard /Actrapid at $P \leq 0.05$.

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
Mosul University / College of Science
Department of Biology

The Effect of Treatment with Different Types of Insulin on Immune Responses and Gene Expression of Foxp3 in Type 1 Diabetics in Mosul City

Saad Imrrer Ali Abdullah Al- Juboury

M.Sc. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised By

Assistant Professor

Dr. Rojan Ghanim Mohammed Ayoub Al- Allaff

1444 A.H. **202٣ A.D.**