

مطالعه عملکرد نوتروفیلها در بیماران دیابتیک نوع اول به کمک روش کمی لومینسانس

دکتر محمد پژوهی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان شریعی
دکتر محمد حسن باستان حق، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان شریعی
اسداله رجب
دکتر احمد مسعود، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه ایمنولوژی پزشکی
مریم رستنی

Study of Chemiluminescence of Leukocytes in Insulin Dependent Diabetic Patients

ABSTRACT

Infection is one of the important causes of morbidity and mortality in diabetic patients. It has been reported that poorly controlled patients are more susceptible to infection, hence we examined the chemiluminescence of leukocytes from insulin dependent diabetic patients in response to a soluble (phorbol meristate acetate) and particular stimulus (opsonized zymosan)

The patients were divided into two separate groups, only controlled and well controlled, in regard to their blood glucose. Using PMA as a stimulus leukocytes from both groups, patients showed no significant difference comparing with healthy controls, but that of the two groups of patients were significantly different ($P < 0.05$). When opsonized zymosan was used as the stimulus, no statistically significant difference was observed between all of the coupled groups. However, the chemiluminescence of leukocytes from poorly controlled patients was lower than the other groups.

Key Words : Chemiluminescence, Diabetes, Leukocyte

چکیده

دهیم. وقتی که از PMA به عنوان محرک استفاده گردید، اختلاف معنی داری بین دو گروه آزمایش با گروه شاهد مشاهده نگردید، با این حال اختلاف بین دو گروه بیماران کنترل شده و کنترل نشده معنی دار بود ($P < 0.05$). همچنین با استفاده از مخمر اپسونیزه به عنوان محرک بین گروههای آزمایش و شاهد اختلاف معنی داری مشاهده نگردید، با این وجود میزان کمی لومینسانس در گروه بیماران کنترل شده کاهش نشان داد.

از آنجا که ابتلا به عفونت یکی از عوامل مهم مرگ و میر در بیماران دیابتی است و گفته می شود که میزان حساسیت به عفونت در این بیماران با کنترل قند آنان ارتباط دارد، بر آن شدیم عملکرد لکوسیت های بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس وابسته به انسولین را در دو گروه قند خون کنترل شده و کنترل نشده در سنین ۷ تا ۲۵ سال در پاسخ به یک محرک (فوربول مریستات استات یا PMA) و یک محرک ذره ای (مخمر اپسونیزه) به کمک روش کمی لومینسانس مورد بررسی قرار

مقدمه

دیابت ملیتوس، شایعترین بیماری متابولیک بوده به دو دسته وابسته به انسولین (IDDM) و غیر وابسته به انسولین (NIDDM) تقسیم می‌شود (۱).

فاگوسیتوز یکی از مکانیزم‌های اصلی دفاعی در کنترل عفونت‌هاست. در این پدیده میکروارگانیسم‌ها و ذرات دیگر پس از اتصال به سطح سلول فاگوسیت مثل نوتروفیل و ماکروفاژ، آندوسیتوز شده و سپس اعمال داخلی سلولی جهت کشتن و از بین بردن این ذرات فعال می‌شوند که از جمله این اعمال وقوع انفجار تنفسی در نوتروفیل است. انفجار تنفسی در نوتروفیلها با افزایش مصرف اکسیژن، تولید سوپراکسید و پدیده کمی لومینسانس همراه است (۲،۳).

عقیده عمومی بر این است که استعداد ابتلاء به عفونت‌ها در افراد مبتلا به دیابت ملیتوس بیشتر از افراد سالم می‌باشد و در واقع افرادی که به هر دلیل دچار نقص با اختلال در عملکرد نوتروفیل‌هایشان هستند، به میزان زیادی در مقابل عفونت‌ها، حساس می‌باشند. بر این اساس، بررسی عملکرد نوتروفیلها در بیماران IDDM که گفته می‌شود، در صورت عدم کنترل مطلوب قند خون، احتمال ابتلا به عفونت یا شدت عفونت در آنها افزایش می‌یابد، حائز اهمیت خواهد بود (۴).

ما در این تحقیق، در صدد پی بردن به این نکته بودیم که آیا در بیماران مبتلا به IDDM عملکرد نوتروفیلها دچار تغییر می‌گردد و آیا این تغییر با کنترل قند خون بیماران رابطه دارد؟ هدف از این تحقیق، بررسی مقایسه‌ای عملکرد لکوسیت‌ها در بیماران IDDM در دو گروه کنترل شده و کنترل نشده از نظر قند خون با استفاده از تکنیک کمی لومینسانس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مشخصات بیماران

در این مطالعه تعداد ۵۰ نفر از بیماران IDDM، در سنین ۵ تا ۲۴ سال با میانگین ۱۵ سال مورد بررسی قرار گرفتند. بیماران از نظر کنترل میزان قند خون به دو گروه کنترل شده و کنترل نشده تقسیم شدند. گروه بیماران کنترل شده شامل ۲۴

نفر که ۱۲ نفر آنها دختر و ۱۱ نفر پسر بودند.

سن آنها از ۵ تا ۲۴ سال با میانگین ۱۵/۸ بوده و حداقل مدت ابتلا این بیماران یکسال و حداکثر ۱۷ سال با میانگین ۵ سال بوده است. گروه بیماران کنترل نشده شامل ۲۶ نفر که ۱۱ نفر آنها پسر و ۱۵ نفر دختر بودند. سن آنها از ۸ تا ۲۲ سال با میانگین ۱۴/۸- بوده، حداقل مدت ابتلا این گروه از بیماران، یکسال و حداکثر ۱۷ سال با میانگین ۶/۴ سال بوده است. گروه شاهد شامل ۱۳ نفر که ۷ نفر آنها دختر و ۶ نفر پسر بوده و سن آنها از ۹ تا ۲۵ سال با میانگین ۱۶/۴ بوده است.

روش نمونه‌گیری خون

ابتدا سرنگ ۵ ml را هپارینه کرده و سپس از هر بیمار، ۳ میلی لیتر خون می‌گرفتیم. نمونه‌ها داخل سرنگ به آزمایشگاه گروه ایمونولوژی منتقل شده و آزمایشات مربوطه در همین محل انجام می‌گردید.

انجام آزمایشات

نمونه‌های جمع‌آوری شده در همان روز مورد آزمایش قرار گرفته و هر روز حداکثر ۲ نمونه مورد بررسی قرار می‌گرفت. قبل از شروع مرحله جداسازی سلولی، یک گسترش خونی از نمونه‌ها تهیه ثابت و رنگ آمیزی شده و از نظر درصد گلبولهای سفید مورد بررسی قرار می‌گرفت. برای انجام مراحل مختلف کار یعنی جداسازی، شمارش و تحریک سلولی نیاز به مواد و محلولهای زیر بودیم:

۱- بافر PBS

۲- محلول لیزینیک (Lysnig)

۳- دکستران ۰.۶٪

۴- PMA (Phorbol Myrestate Acetate)

۵- مخمر اپسونیزه

۶- محلول شمارش گلبول سفید

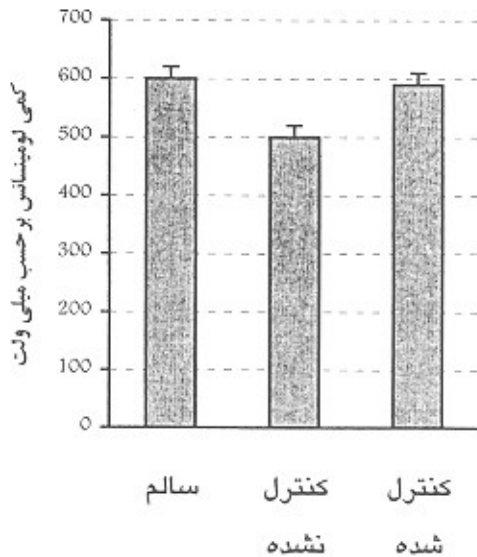
۷- ریموزان

آنگاه به کمک دکستران ۰.۶٪ گلبولهای سفید را از ۳ میلی لیتر خون هپارینه جدا نموده و پس از مجاورت با محلول لیزینیک گلبول قرمز را از محیط خارج نمودیم. سپس سلولهای سفید را با سرم فیزیولوژی شستشو داده و حجم نهایی را با محلول بافر به یک میلی لیتر می‌رسانیم، پس از شمارش سلولی در لام

جهت تحلیل آماری نتایج ابتدا میانگین مقادیر کمی لومینسانس بدست آمده پس از تحریک با PMA و زیموزان، بطور جداگانه در هر یک از ۳ گروه تحت مطالعه محاسبه گردید و مقایسه بین گروههای آزمایش با شاهد با استفاده از آزمون Unpaired two tail t-test انجام گرفت.

نتایج

مقادیر کمی لومینسانس ناشی از وقوع انفجار تنفسی در لکوسیت‌ها پس از تحریک با PMA و زیموزان، در بیماران کنترل شده، بیماران کنترل نشده و افراد سالم در شکل‌های ۱ تا ۶ نشان داده شده است.



شکل ۱- مقایسه کمی لومینسانس لکوسیت‌ها پس از تحریک با زیموزان در سه گروه بیماران کنترل شده، بیماران کنترل نشده و افراد سالم

مقادیر کمی لومینسانس لکوسیت‌ها پس از تحریک با PMA در دو گروه آزمایش با شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، در حالیکه بین دو گروه بیماران کنترل شده و بیماران کنترل نشده، اختلاف معنی‌دار دیده شد ($P < 0.05$). همچنین مقادیر کمی لومینسانس لکوسیت‌ها پس از تحریک با زیموزان در دو گروه بیماران با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداده بین دو گروه بیماران نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید (شکل ۱).

تومایانوبار غلظت نهایی آن به 10^6 پلی مرفونوکلتر نوتروفیل در هر میلی‌لیتر می‌رسانیم. زنده بودن سلولهای جدا شده را با استفاده از رنگ اتوزین مورد بررسی قرار می‌دهیم. در بررسی ما ۹۵٪ از سلولها با چنین روشی زنده بودند. آخرین مرحله کار اندازه‌گیری لومینسانس نمونه‌های سلولی پس از تحریک آنها با محرکهای PMA و مخمر اپسونیزه توسط دستگاه لومینومتر از نوع LKB 1251 بوده است (۸).

اندازه‌گیری کمی لومینسانس لکوسیت‌ها

استفاده از PMA به عنوان محرک

۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی (با غلظت 10^6 در میلی‌لیتر)، ۰/۱ میلی‌لیتر لومینول (با غلظت 4×10^{-4}) و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر PBS را در کووت مخصوص ریخته و درست قبل از قرار دادن آن در دستگاه لومینومتر، ۰/۲ میلی‌لیتر PMA به آن اضافه کرده و بخوبی مخلوط می‌کردیم و بلافاصله کووت در دستگاه قرار می‌گرفت.

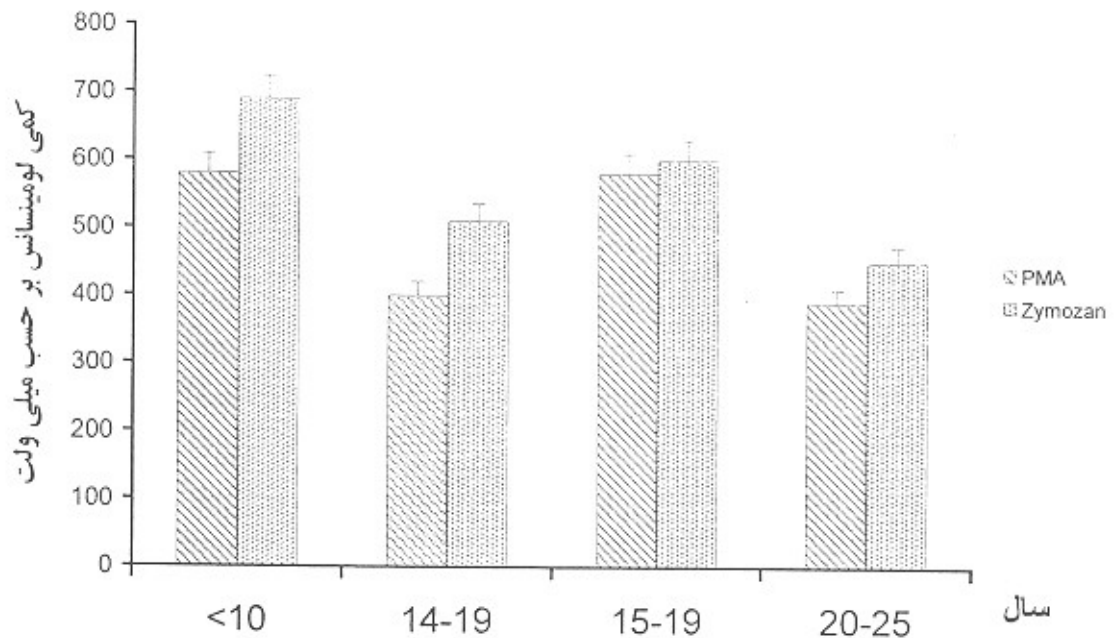
استفاده از مخمر اپسونیزه به عنوان محرک

۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی (با غلظت 10^6 سلول در میلی‌لیتر) و ۰/۱ میلی‌لیتر (با غلظت 2×10^{-4}) را در کووت مخصوص ریخته و درست قبل از قرار دادن آن در دستگاه لومینومتر، ۰/۱ میلی‌لیتر از مخمر اپسونیزه (که قبلاً در همان روز تهیه می‌شد) به آن اضافه می‌کردیم و خوب مخلوط می‌کردیم و بلافاصله کووت در دستگاه قرار می‌گرفت.

هر دو محرک PMA و مخمر اپسونیزه، برای یک نمونه سلولی مورد استفاده قرار می‌گرفت و برای تعداد محدودی از نمونه‌ها، فقط یک ماده محرک مورد استفاده قرار گرفت. سپس یک نمونه کنترل یا background (بدون اضافه کردن ماده محرک) برای بررسی کمی لومینسانس زمینه هر نمونه خوانده می‌شد.

برای هر دو محرک PMA و مخمر اپسونیزه، میزان کمی لومینسانس بر حسب میلی‌ولت در فاصله‌های مشخص (زمان شروع ۶، ۴، ۲ و ... دقیقه و زمان ماکزیمم مقدار کمی لومینسانس) در فرم‌های مخصوص یادداشت می‌گردید.

تجزیه و تحلیل آماری



شکل ۲- مقایسه کمی لومینسانس لکوسیت‌های بیماران در چهار گروه سنی پس از تحریک با زیموزان و PMA

در مرحله بعد، رابطه بین مدت ابتلا بیماران به بیماری دیابت و کمی لومینسانس لکوسیت‌های آنان پس از تحریک با PMA و زیموزان - بدون در نظر گرفتن وضعیت کنترل قند خون آنان - مورد بررسی قرار گرفت.

اختلاف معنی داری بین میانگین شدت کمی لومینسانس لکوسیت‌ها در ۳ گروه بیماران از نظر مدت ابتلا، پس از تحریک با PMA وجود ندارد (شکل ۳).

در این مورد نیز اختلاف معنی داری بین میانگین شدت کمی لومینسانس در ۳ گروه بیماران از نظر مدت ابتلا، وجود ندارد (شکل ۳).

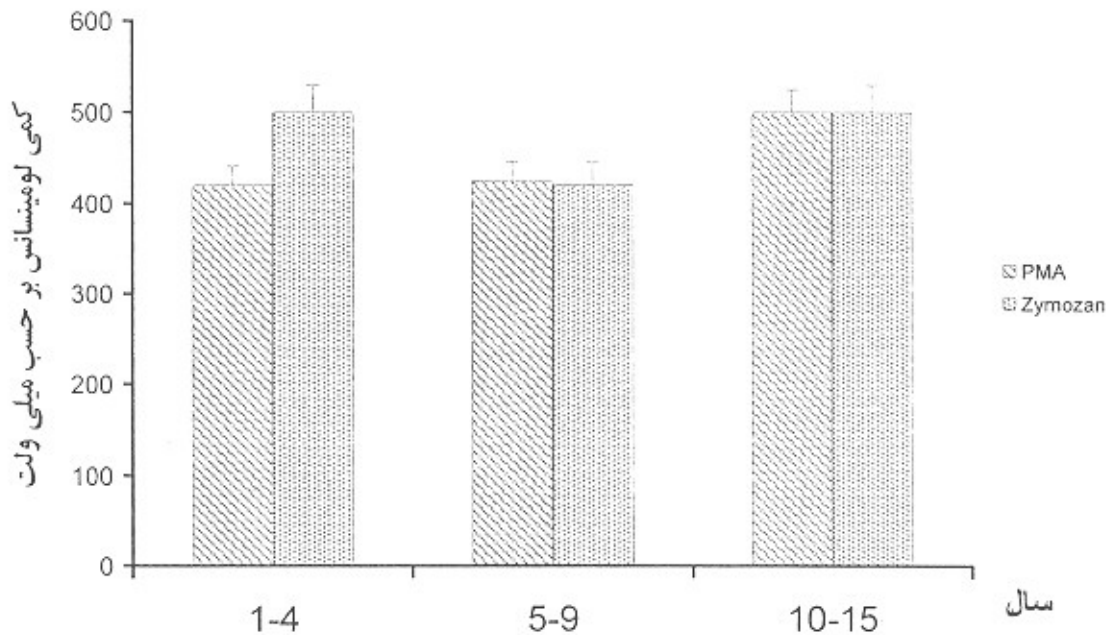
بحث

عقیده عمومی بر این است که استعداد ابتلا به عفونت‌ها در افراد مبتلا به دیابت ملیتوس (صرفنظر از تیپ I و II آن) بیشتر از افراد سالم می‌باشد. تصور می‌شود که بخشی از علت این حساسیت غیرطبیعی، مربوط به اختلال عملکرد نوتروفیلها باشد: اختلال عمل فاگوسیتوز، کموتاکسی، عمل killing داخل سلولی و چسبیدن به سلولهای اندوتلیال در سلولهای پلئوفونوکلاثر (PMNS) بیماران دیابتی گزارش شده است (۵).

جهت بررسی کمی لومینسانس لکوسیت‌های بیماران بر اساس سن آنها، صرفنظر از وضعیت کنترل قند خون، بیماران را در چهار گروه سنی کمتر از ۱۰ سال، ۱۴-۱۰ سال، ۱۹-۱۵ سال و ۲۵-۲۰ سال دسته‌بندی کردیم. نتایج بدست آمده بشرح زیر است:

میانگین شدت کمی لومینسانس لکوسیت‌ها پس از تحریک با PMA در دو گروه سنی ۱۴-۱۰ سال و ۲۵-۲۰ سال بطور معنی داری کمتر از دو گروه دیگر می‌باشد. بدین ترتیب که اختلاف گروه اول با گروه دوم با $P < 0/05$ و با گروه چهارم با $P < 0/01$ و گروه دوم با گروه سوم با $P < 0/05$ و گروه سوم با گروه چهارم با $P < 0/05$ معنی دار می‌باشد (شکل ۲).

اختلاف معنی داری بین میانگین شدت کمی لومینسانس لکوسیت‌ها پس از تحریک با زیموزان در چهار گروه سنی وجود ندارد (شکل ۲). در این نمودار مشخص می‌گردد که صرف نظر از معنی دار بودن یا نبودن اختلاف میانگین شدت کمی لومینسانس در چهار گروه سنی تغییرات میانگین شدت کمی لومینسانس پس از تحریک با PMA و زیموزان، از الگوی نسبتاً مشابهی پیروی می‌نماید.



شکل ۳- مقایسه کمی لومینسانس لکوسیت‌های بیماران بر اساس مدت ابتلا به بیماری پس از تحریک با زیموزان و PMA

NiDDM، بطور معنی‌داری بیشتر از افراد کنترل می‌باشد. آنها همچنین دریافتند بیمارانی که بالاترین میزان کمی لومینسانس را نشان دادند. آنتی‌بی بودند که عوارض بالینی میکروووسکولار داشته‌اند (۵).

همچنین عمل فاگوسیتیک لکوسیتها با استفاده از کمی لومینسانس خون تام و ذرات زیموزان اپسونیزه در بیماران NiDDM بد کنترل، در سال ۱۹۸۹ توسط Maccury و همکارانش مورد مطالعه قرار گرفت. از ۱۹ نفر افراد تحت مطالعه، ۱۰ نفر، قند خونشان طی ۱۲ هفته کنترل شده و از این ۱۰ نفر، ۷ نفر فعالیت فاگوسیتوزشان بهبودی حاصل کرد. از ۹ نفر بیمار کنترل نشده، ۸ نفر در فعالیت فاگوسیتوزشان بهبودی حاصل نگردید (۱۰).

Kantar و همکارانش در سال ۱۹۹۰، انفجار تنفسی PMNs بیماران IDDM را با استفاده از تکنیک کمی لومینسانس و بکار بردن PMA به عنوان محرک بررسی نموده‌اند. آنها مشاهده کردند که فعالیت کمی لومینسانس PMNs در حال استراحت بیماران (یعنی کمی لومینسانس بازال) بطور معنی‌داری بیشتر از افراد کنترل می‌باشد. آنها نسبت کمی لومینسانس PMNs پس از تحریک با PMA به کمی لومینسانس بازال را به عنوان ایندکس فعالیت در نظر

محققین در این زمینه، مطالعات زیادی با استفاده از تکنیکهای متعدد انجام داده‌اند، اما نتایج متضادی از نظر عملکرد نوتروفیلها بدست آمده است (۶، ۷، ۸).

Shah و همکارانش در سال ۱۹۸۳، فعالیت فاگوسیتوز و Killing لکوسیت‌های افراد دیابتی (بین سنین ۶۷-۲۱ سال) را با استفاده از تکنیک کمی لومینسانس و بکار بردن فوربول مرستات استات (PMA) و زیموزان به عنوان محرک، بررسی کردند. آنها همچنین تولید سوپراکسید آنیون را با استفاده از روش Babior و Curnette اندازه‌گیری نمودند. در این روش از احیای فری‌سیتوکروم C توسط PMNs که می‌تواند توسط سوپراکسید دسموتاز ممانعت شود، برای اندازه‌گیری میزان سوپراکسید آنیون استفاده می‌گردد. از طرف دیگر لکوسیت‌های افراد دیابتی با سرم خون آن افراد و سرم افراد سالم و لکوسیت‌های افراد سالم نیز با سرم خود آن افراد و سرم بیماران دیابتی مجاور شده و کمی لومینسانس آنها اندازه‌گیری شد (۹).

Barano و همکارانش در سال ۱۹۸۷، کمی لومینسانس نوتروفیل‌های بیماران IDDM و NiDDM پس از تحریک با زیموزان اپسونیزه را بررسی نمودند. آنها مشاهده کردند که میزان کمی لومینسانس نوتروفیلها هم در بیماران IDDM و

گرفته و دریافتند که این نسبت در بیماران دیابتی بطور معنی داری نسبت به افراد سالم کاهش می‌یابد (۱۱).

بهر حال آنچه که بوضوح دیده می‌شود این است که نتایج آزمایشات مربوط به فاگوسیتوز و Killing نوتروفیلها، تا حدی با هم متفاوت بوده و یافته‌های محققین مختلف، در بعضی موارد متضاد می‌باشند. احتمال دارد که بخشی از علت این نتایج بعضاً متناقض مربوط به تفاوت سطح کنترل متابولیک در بیماران دیابتی باشد. چرا که کنترل قند خون در بیمار دیابتی یک امر نسبی است. با این وجود، تفاوت در روشهای سنجش فاگوسیتوز و Killing، احتمالاً از اهمیت بیشتری در این رابطه برخوردار است.

در مطالعه ما مشاهده شد که میانگین مقادیر کمی لومینسانس لکوسیت‌ها پس از تحریک با PMA در بیماران کنترل شده و کنترل نشده با افراد سالم، اختلاف معنی داری ندارد. اما در دو گروه بیماران کنترل شده و کنترل نشده، این اختلاف معنی دار می‌باشد. از طرف دیگر میانگین مقادیر کمی لومینسانس لکوسیت‌ها پس از تحریک با زیموزان در بیماران کنترل نشده و بیماران کنترل شده با افراد سالم، اختلاف معنی داری را نشان نمی‌دهد. همچنین بین دو گروه بیماران کنترل شده و کنترل نشده نیز اختلاف معنی دار نمی‌باشد.

صرف‌نظر از معنی دار بودن یا نبودن اختلاف میانگین کمی لومینسانس لکوسیت‌ها بین گروههای بیمار دیابتیک و افراد سالم (پس از تحریک با PMA و زیموزان) میانگین مقادیر کمی لومینسانس در گروه بیماران کنترل نشده، پایین‌تر از بیماران کنترل شده و افراد سالم می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت که فعالیت باکتری‌سیدال نوتروفیلهای بیماران دیابتی در شرایط عدم کنترل مطلوب قند خون، کاهش یافته که ممکن است در افزایش حساسیت این بیماران در مقابل عفونتها، نقش داشته باشد.

استفاده از دو محرک ذره‌ای (زیموزان) و محلول (PMA) بطور همزمان این امکان را به ما می‌دهد که وجود یا عدم وجود اختلال در بلع ذرات توسط نوتروفیل‌ها را بررسی نماییم. با مقایسه شدت کمی لومینسانس لکوسیتها پس از تحریک با PMA و زیموزان در هر یک از گروههای تحت مطالعه، مشاهده شد که اختلاف معنی داری بین مقادیر

کمی لومینسانس حاصل از PMA با مقادیر از تحریک با زیموزان، در هر گروه مورد مطالعه وجود ندارد. اگر عمل بلع نوتروفیلها در هر گروه تحت مطالعه، دچار اختلال باشد. باید انتظار داشته باشیم که شدت کمی لومینسانس ناشی از زیموزان در آن گروه کمتر از شدت کمی لومینسانس پس از تحریک با PMA باشد و در این مطالعه چنین اختلافی مشاهده نگردید. بدین ترتیب می‌توانیم نتیجه بگیریم که کاهش شدت کمی لومینسانس در گروه بیماران کنترل نشده در این تحقیق نه بر اثر وجود اختلال در عمل بلع، بلکه احتمالاً به علت وجود اختلال در عمل Killing نوتروفیل‌ها می‌باشد.

در مورد نتایج بدست آمده در بررسی کمی لومینسانس لکوسیت‌های بیماران بر اساس سن آنها مشاهده کردیم که شدت کمی لومینسانس در دو گروه سنی ۱۴-۱۰ سال و ۲۵-۲۰ سال بطور معنی داری کمتر از دو گروه دیگر می‌باشد. کودکان کمتر از ۱۰ سال معمولاً تحت مراقبت و مواظبت والدین خود قرار دارند و در مورد کودکان دیابتی، تزریق انسولین، اندازه‌گیری مقدار قند خون و سایر مراقبتهای مربوط به بیماران دیابتی، اغلب توسط والدین آنها تحت نظر بوده و کنترل می‌شود. لذا بنظر می‌رسد که کنترل قند خون بیماران دیابتی در این سنین بهتر انجام می‌شود. از طرف دیگر بیماران گروه سنی ۱۴-۱۰ سال، در سنین رشد و بلوغ قرار دارند. در این دوره جوانان جریانات و قوانین را بررسی می‌کنند و بر اساس تجربیات، ارزشهای و قضاوت‌های خود تصمیم می‌گیرند. در سایه این پیشرفت برای جوان دیابتی نیز این دوره می‌تواند مرحله مهمی از زندگی باشد.

بسیار از جوانان مراقبت از بیماری خویش را جدی نمی‌گیرند. هنگام بلوغ علاوه بر تغییرات مرفولوژیک، رشد اسکلت و ماهیچه‌ها نیز منجر به تغییرات بیشتر قند خون می‌شود. شواهد بالینی ثابت می‌کنند که در زمان بلوغ کنترل قند خون در سطح قابل قبولی مشکل است، بنابراین شاید بتوان کاهش شدت کمی لومینسانس لکوسیت‌ها در این گروه سنی را ناشی از مشکل‌تر بودن کنترل قند خون در زمان بلوغ دانست. کاهش شدت کمی لومینسانس در گروه سنی ۲۵-۲۰ سال را احتمالاً می‌توانیم به بالاتر بودن سن بیمار و در اغلب موارد طولانی‌تر بودن سن بیمار و در اغلب موارد طولانی‌تر بودن مدت ابتلا به بیماری مربوط بدانیم. با این حال، بررسی

طرف دیگر، در این تحقیق، حداقل مدت ابتلا در گروه بیماران کنترل نشده، یک سال می باشد. ولی از آنجا که عوارض ثانوی بیماری دیابت و از جمله افزایش حساسیت در مقابل عفونتها، در درازمدت ظاهر می شود، احتمالاً بهتر آن است که حداقل مناسبی از نظر مدت ابتلا در دسته بندی بیماران کنترل نشده دیابتی در نظر گرفته شود و این مسأله می تواند در تحقیقات بعدی مورد توجه قرار گیرد.

منابع

- 1- Castano L, Eisenbarth GS. Type1 diabetes: A chronic autoimmune disease of human, mouse and rat. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 647-79
- 2- Csato M, Dobozy A, Simon N. Study of phagocytic function with a quantitative nitroblue-tetrazolizm (NBT) reduction test in diabetes mellitus. *Arch Dermatol Res* 1980; 268(3): 283-8
- 3- Attenuated Neurtophil respiratory burst following acute hydroglycemia in diabetic patients and Normal subjects. *Acta Diabetol* 1997; 34(4): 253-6
- 4- Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med* 1997; 14(1): 129-34.
- 5- Baranao R, Garberi JC, Tesone PA, Rumi LS. Evaluation of neutrophil activity and circulating Immune complexes levels in diabetic patients. *Horm Metab Res* 1987; 19: 371-4.
- 6- Davidson NJ, Sowden JM, Fletcher J. Defective phagocytosis in insulin controlled diabetes: Evidence for a reaction between glucose and opsonising proteins. *J Clin path* 1984; 37(7): 733-6.
- 7- Gentle TA. Neutrophil function tests in clinical Immunology. in : *clinical Immunology: A practical approach*. IRC press: 1991.
- 8- Marthoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic onrol of diabetes. *Diabetes Care* 1990; 15(2) 256-60.
- 9- Shah VS, Wallin JD, Eilen DS. Chemiluminescence and superoxide anion production by leukocyte from diabetic patients. *J Clin Endo Meta* 1983; 57: 402-409.
- 10- Mercury SM, Gemmel CG, Paterson KR, Maccuish AC. Changes in phagocytic function with glycaemic control in diabetic patients. *J Clin pathol* 1979; 42(1): 43-47.
- 11- Kantar A. Altrations of the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes from diabetic children. *Acta paed Scand* 1990; 79: 535-541.