

## MODULATION DE L'INSULINO-SECRETION PAR LES CYTOKINES CHEZ LE RAT DES SABLES ET LE RAT WISTAR: ETUDE INTERSPECIFIQUE

Reçu le 25/01/1999 – Accepté le 18/12/2001

### Résumé

Le diabète de type I est un processus chronique, secondaire à la destruction sélective et progressive du potentiel insulino-sécréteur par le système immunitaire. Les différentes populations de cellules immunitaires ont été toutes mises en cause; mais à l'heure actuelle, le degré d'implication de chaque type cellulaire ainsi que leurs mécanismes d'action restent encore mal connus. Au cours de cette dernière décennie, nous avons assisté à l'émergence d'un nouveau concept, selon lequel les produits de sécrétion des cellules immunitaires désignés sous le terme générique de cytokines pourraient prendre une part importante dans le processus pathogène du DID.

Dans cette étude, nous avons comparé l'activité insulinosécrétoire des îlots de Langerhans isolés du rat Wistar et du rat des sables, afin de déterminer les variations interspécifiques. Nos résultats préliminaires indiquent que l'effet le plus probant est observé en présence de l'IL-1 $\beta$ . En effet, cette cytokine stimule la sécrétion d'insuline de manière dose-dépendante également chez le rat des sables; toutefois, l'amplitude de la réponse est plus prononcée chez le rongeur désertique, avec une augmentation du taux de l'insuline libérée de l'ordre de 147%, en présence d'une concentration de 20 UI/ml de l'IL-1 $\beta$ , comparée à la sécrétion basale. Quant à l'IL-2, nous n'avons enregistré aucune modification dans l'activité insulinosécrétoire des 2 espèces.

**Mots clés:** diabète, insuline, rat Wistar, rat des sables, cytokine.

### Abstract

The diabetes of the type I is a chronic process, secondary with the selective and progressive destruction of the insulino-secreting potential by the immune system. The various populations of immunizing cells were all criticized; but it still remains, at the present time, badly known the degree of the implication of each cellular type as well as their action mechanisms. During this last decade, we attended to the emergence of a new concept, according to which the products of secretion of the immunizing cells indicated under the generic term of cytokines could take a significant part in the pathogenic process of the DID.

In this article, we have compared the insulino-secretory activity of small islands of Langerhans isolated from the Wistar rat and the rat of sands, in order to determine the interspecific variation. Our preliminary results indicate that the most convincing effect is observed in the presence of IL-1 $\beta$ . Indeed, this cytokine stimulates the insulin secretion in a way amount-dependent as well in the rat of sands; however, the amplitude of the response is more marked in the desert rodent, with an increase of the rate of the insulin released about 147%, in the presence of a concentration of 20 UI/ml of IL-1 $\beta$ , compared with basal secretion. As for the IL-2, we did not record any modification in the insulino-secretory activity of the two species.

**Key words:** diabetes, insulin, Wistar rat, rat of sands, cytokine.

### A. HADDAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biochimie  
Faculté des Sciences  
Médicales. Université de  
Tizi-Ouzou 15000, Algérie

### A. KHALKHAL<sup>2</sup>

### Y. DAHMANI<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Laboratoire de Physiologie  
de la Nutrition, I.S.N.,  
USTHB, BP 32- El Alia  
Alger, Algérie

### P. DESCHAUX<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Laboratoire d'immuno-  
physiologie  
123, rue Albert Thomas  
87060 Limoges, France

### ملخص

إن مرض السكر من الصنف – 1 هو عبارة عن خلل في جهاز المناعة والذي يؤدي في نهاية الأمر إلى تحطيم بصفة مميزة الخلايا المنتجة للأنسولين في العشرية الأخيرة ظهر إلى الوجود مفهوم جديد والذي بمقتضاه قد يكون لبعض إفرازات الخلايا المناعية والمسلمات بالسيتوكينات دور هام في تطور مرض السكر.

في هذه الدراسة إهتمنا بفعالية في سيتوكينات على كمية الأنسولين المفررة من قبل خلايا B البنكرياسية والمعزولة من صنفين من الفئران فأر ويستار وفأر الرمال (الجرد). أدلت النتائج على وجود إجابة مميزة ما بين الصنفين وخاصة إذا تعلق الأمر بالتنبيه المترتب بالأنترلوكين – 1 (IL-1).  
**الكلمات المفتاحية:** مرض السكر، أنسولين، فأر ويستار، فأر الرمال، سيتوكينات.

Le diabète de type I ou le diabète insulino-dépendant (DID) est caractérisé par la destruction auto-immune des cellules  $\beta$  pancréatiques, et les premiers signes cliniques comprenant des troubles de l'utilisation du glucose, polyuro-polydipsie, amaigrissement et fatigue, apparaissent relativement tard dans la chronologie des faits. En effet, chez l'homme, les anticorps dirigés contre les constituants des îlots de Langerhans sont détectés 8 à 10 ans avant le diagnostic clinique de la maladie [1]. Quand le D.I.D est cliniquement décelable, l'altération anatomo-fonctionnelle du pancréas devient irréversible et, à ce stade, la masse des cellules B du pancréas est déjà détruite à 90%.

L'étiologie du DID est certainement multifactorielle impliquant à la fois des facteurs génétiques et les facteurs de l'environnement [2].

L'observation histopathologique la plus caractéristique du DID aussi bien chez l'homme [3] que chez les modèles animaux [4,5] est l'infiltration du pancréas endocrine par les cellules mononucléaires ou insulite.

Les différentes populations de cellules mononucléaires ont été incriminées dans le processus pathogène: les macrophages chez le rat

BB [6,7], les cellules Th (helpers) chez la souris NOD [8,9], les cellules NK (natural killers) chez le rat BB [10].

Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont établi que ces différentes cellules pouvaient induire, par l'intermédiaire de leurs produits de sécrétion, des altérations fonctionnelles et lyse des cellules B du pancréas [11-15].

D'autre part, les travaux antérieurs de notre laboratoire ont montré que le rat des sables *Psammomys obesus* développe un syndrome diabétique lorsqu'il est soumis à un régime hypercalorique [16].

L'apparition et le développement du diabète chez le rat des sables passe par différents stades: obésité, diabète pléthorique et diabète insulino-dépendant [17-20].

Dans cette étude, nous nous sommes proposés d'explorer les effets de 3 cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2 et IFN- $\gamma$ ) sur la fonction insulinosécrétoire des îlots de Langerhans isolés à partir de 2 rongeurs: le rat des sables (*Psammomys obesus*) et le rat Wistar, afin d'établir d'éventuelles variations interspécifiques.

## MATERIEL ET TECHNIQUES

Notre expérimentation a porté sur 12 rats des sables provenant de la station de Beni-Abbès et 12 rats Wistar provenant de l'institut Pasteur d'Alger. Les rats des sables sont nourris aux plantes halophiles de la famille des Chenopodiacees et les rats Wistar sont nourris au régime standard de laboratoire.

Après sacrifice de l'animal par décapitation, les îlots de Langerhans sont isolés selon la technique de Lacy & Kostianovsky [21], basée sur la digestion par la callagénase des fibres de collagène, ce qui permet de libérer les îlots du reste du tissu exocrine. Les îlots, ainsi isolés, sont incubés pendant 90 minutes dans la solution de KRBA gazée au carbogène.

L'insuline libérée dans le milieu d'incubation est dosée selon la technique radio-immunologique (RIA).

## RESULTATS ET DISCUSSION

La sensibilité de la cellule B pancréatique à l'action des cytokines a été étudiée par le dosage de l'insuline libérée dans le milieu d'incubation par les îlots de Langerhans isolés.

La figure 1 montre le profil insulino-crétoire en réponse à des doses croissantes de l'interleukine-1 $\beta$ . Cette cytokine induit une stimulation dose-dépendante. Son effet maximal a été observé à la concentration de 20 UI/ml pour laquelle nous avons enregistré une sécrétion moyenne de l'insuline de (129,6  $\pm$  12,8)  $\mu$ UI/ml. Comparée à la sécrétion basale de (73,9  $\pm$  8,2)  $\mu$ UI/ml, il y a une augmentation de l'ordre de 75%. Cet effet stimulateur de l'IL-1 $\beta$  est totalement absent quand l'effet de ces mêmes concentrations de cytokine est étudié dans un milieu d'incubation dépourvu de glucose. En effet, dans ces conditions, le profil insulino-crétoire ne montre pas de différences significatives dans les quantités d'insuline libérée (Fig. 1).

En présence de concentrations croissantes de l'interleukine-2 (IL-2), la sécrétion d'insuline des îlots de

Langerhans isolés n'est pas affectée, comparée à la valeur basale (Fig. 2).

Dans la figure 3, nous avons représenté la variation de l'effet de concentrations croissantes de l'interféron- $\gamma$ . Nos résultats montrent que seule la concentration la plus élevée de notre protocole expérimental (400 UI/ml) est capable d'induire une diminution dans la quantité d'insuline libérée. Cette diminution est de l'ordre de 21%, comparée à la sécrétion basale. A noter que cet effet inhibiteur, quoique modéré, n'est observé qu'en présence du glucose dans le milieu d'incubation.

Notre étude a porté, en outre, sur la comparaison interspécifique entre le rat Wistar et le rat des sables *Psammomys obesus* quant à la variation de leur réponse insulino-crétoire en présence des 3 cytokines considérées.

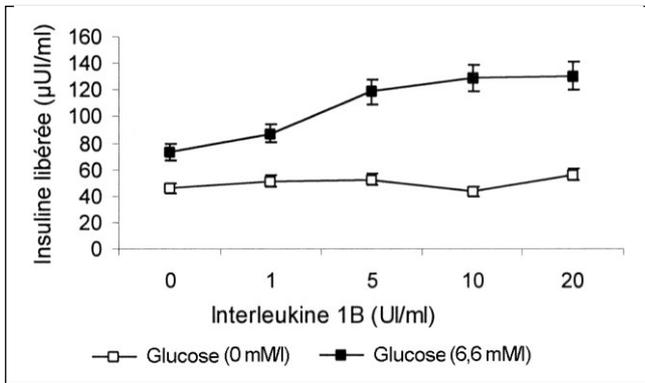
La comparaison des courbes dose-réponse insulino-crétoire montre (fig.4) que l'IL-1 $\beta$  stimule la sécrétion d'insuline des îlots isolés chez le rat des sables comme chez le rat Wistar, de manière dose-dépendante, mais avec une plus grande efficacité chez le rongeur désertique. En effet, aux concentrations de 10 et 20 UI/ml de cette cytokine, nous avons noté des valeurs moyennes pour l'insuline libérée dans le milieu d'incubation de (188,5  $\pm$  20,3) et de (225,2  $\pm$  26,4)  $\mu$ UI/ml, ce qui représente des taux de stimulation respectifs de l'ordre de 106% et 147%. Comme chez le rat Wistar, les différentes doses de l'IL-2 n'affectent aucunement la sécrétion d'insuline des îlots de Langerhans isolés du rat des sables (fig.5).

L'effet inhibiteur de la concentration la plus élevée de l'IFN- $\gamma$ , chez le rat Wistar, a été également observé chez le rat des sables (fig.6).

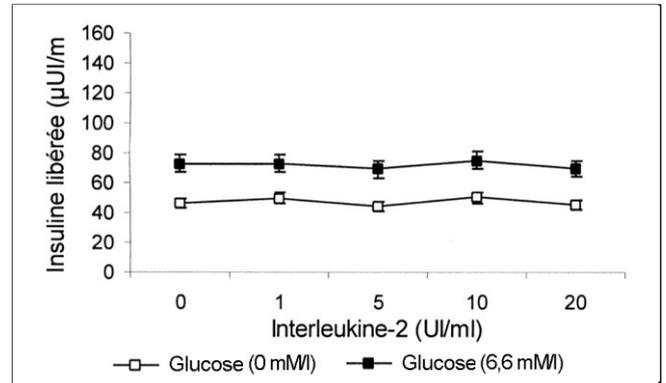
Les cytokines servent de signaux modulateurs exerçant leurs effets sur les cellules immunitaires [22]. En plus des effets immunologiques importants des cytokines, de nombreux autres systèmes sont fortement sensibles à leurs effets [23,24]. De nombreuses études récentes ont suggéré que les cytokines pourraient induire des altérations fonctionnelles et lyse des cellules B pancréatiques au cours du processus pathogène du DID [14,23-26].

Nos données sur la stimulation dose-dépendante de l'IL-1 $\beta$  sont en parfait accord avec les résultats rapportés par Palmer *et al.* [14] et SPINAS *et al.* [25]. Ces auteurs ont, eux aussi, travaillé sur les îlots de rongeurs, mais avec des temps d'incubation variables, pouvant aller jusqu'à 12 heures.

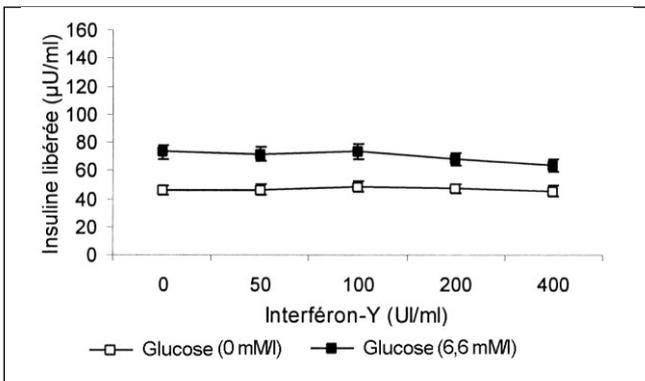
Par ailleurs, il a été montré que l'IL-1 $\beta$  exerce un effet biphasique sur la sécrétion d'insuline des îlots de Langerhans isolés, c'est-à-dire à la phase de la stimulation succède un effet inhibiteur, lorsque la durée d'incubation est prolongée au-delà de 12 heures [14,15]. Selon ces derniers auteurs, les cellules B pancréatiques incubées en présence de l'IL-1 $\beta$  montrent une augmentation du flux calcique du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, ce qui provoque la sécrétion d'insuline. En effet, il est bien connu que toute sécrétion d'insuline est précédée par l'augmentation intracellulaire de la concentration calcique. Ils ont rapporté, en outre, que cette augmentation de la concentration calcique disparaît après 5 heures d'incubation. Bien que l'augmentation de la concentration en ions calcium au niveau des cellules B du



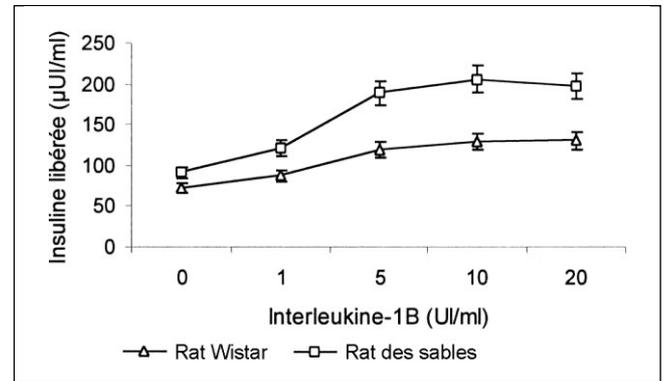
**Figure 1:** Effet de l'interleukine-1 $\beta$  sur l'insulinosécrétion des îlots de Langerhans isolés du rat Wistar: Influence du glucose.



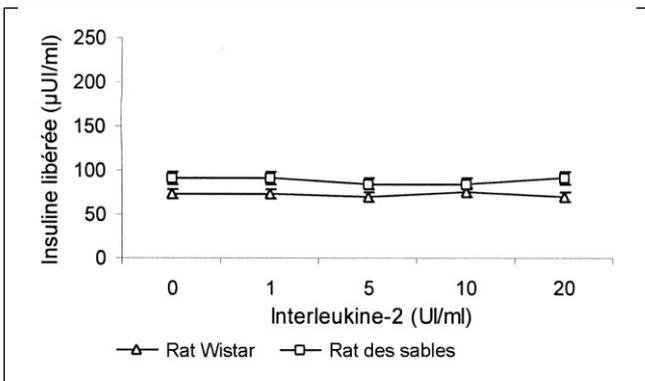
**Figure 2:** Effet de l'interleukine-2 sur l'insulinosécrétion des îlots de Langerhans isolés du rat Wistar: Influence du glucose.



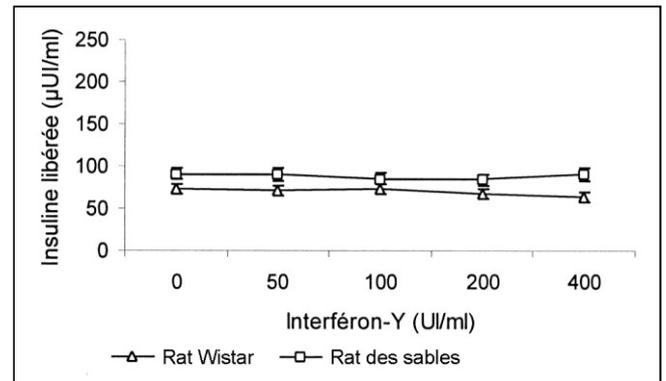
**Figure 3:** Effet de l'interleukine- $\gamma$  sur l'insulinosécrétion des îlots de Langerhans isolés du rat Wistar: Influence du glucose.



**Figure 4:** Effet de l'interleukine-1 $\beta$  sur l'insulinosécrétion des îlots de Langerhans isolés: comparaison interspécifique.



**Figure 5:** Effet de l'interleukine-2 sur l'insulinosécrétion des îlots de Langerhans isolés: comparaison interspécifique.



**Figure 6:** Effet de l'interleukine- $\gamma$  sur l'insulinosécrétion des îlots de Langerhans isolés: comparaison interspécifique.

pancréas soit indispensable, l'induction de la sécrétion d'insuline nécessite probablement l'intervention d'autres messagers intracellulaires tels que les phosphoinositides et l'AMP qui activeraient une variété de protéines kinases [26]. Mais à l'heure actuelle, la séquence biochimique des événements qui interviennent depuis la liaison de l'IL-1 $\beta$  jusqu'à la réponse cellulaire reste encore mal élucidée.

La technique d'incubation que nous avons utilisée au cours de notre expérimentation ne permet de rendre compte que de l'effet à court terme de l'IL-1 $\beta$  sur la sécrétion d'insuline de îlots de Langerhans isolés. Rappelons que l'effet à long terme de l'IL-1 $\beta$  est l'inhibition de l'insulinosécrétion, processus par lequel la cytokine

exercerait son effet toxique au cours du DID.

De nombreux auteurs suggèrent ces deux effets contradictoires exercés par l'IL-1 $\beta$  qui n'empruntent pas les mêmes voies de transduction. En effet, l'action inhibitrice de l'IL-1 $\beta$  semble être due à l'accumulation de radicaux libres dont le mieux connu est l'oxyde d'azote (NO) qui est produit par l'action d'une enzyme spécifique, l'oxyde nitrique synthétase [27-31].

De plus, nos résultats soulignent la présence indispensable du glucose dans le milieu d'incubation pour que l'effet stimulateur de l'IL-1 $\beta$  puisse s'exercer. Cette observation renforce l'interprétation selon laquelle l'effet stimulateur de l'IL-1 $\beta$  est un processus de dépendance

nutritionnelle [13,26]. Mais il reste à établir si cette dépendance est spécifique du glucose.

Durant le processus de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, l'augmentation du métabolisme énergétique et, par conséquent, la formation de l'ATP par la cellule B du pancréas, conduit à la dépolarisation de la membrane plasmique et à l'influx du calcium extracellulaire à travers les canaux voltage-dépendants. L'augmentation de la concentration en ions calcium déclenche la libération de l'insuline [12,32,33].

D'autre part, nos résultats sur l'absence de l'effet de l'IL-2 sur l'insulinosécrétion des îlots isolés, aussi bien du rat Wistar que du rat des sables, rejoignent les observations de Handler et al. [34]. Il semblerait que cette cytokine présente un spectre d'action spécifique du système immunitaire [22].

Concernant les effets de l'IFN- $\gamma$ , nos données indiquent que la concentration la plus élevée de notre protocole (400 UI/ml) exerce un effet inhibiteur modéré sur les îlots de Langerhans isolés du rat Wistar, alors qu'elle reste sans effet chez le rat des sables. Ces résultats sont à rapprocher des observations faites par Rhodes & Taylor [35] et par Rabinovitch et al. [36] qui ont rapporté un effet inhibiteur important de l'IFN- $\gamma$ ; mais il convient de signaler que ces auteurs ont travaillé sur des concentrations plus élevées de la cytokine et avec la technique de culture des îlots qui permet des temps d'action plus prolongés que les nôtres.

En conclusion, des trois cytokines que nous avons testées, seule l'IL-1 $\beta$  affecte la sécrétion d'insuline des îlots isolés de manière probante. Elle stimule la sécrétion d'insuline de manière dose-dépendante. Cet effet nécessite la présence du glucose dans le milieu d'incubation. L'effet stimulateur de l'IL-1 $\beta$  est encore plus prononcé chez le rat des sables comparé au rat Wistar, ce qui suggère une plus grande sensibilité des cellules  $\beta$  pancréatiques du rongeur désertique à l'action de la cytokine. L'IFN- $\gamma$ , à la concentration la plus élevée de notre protocole expérimental, montre un effet inhibiteur, qui reste toutefois modéré.

Nos résultats restent fragmentaires et, à ce stade, il est très difficile d'avancer une base conceptuelle susceptible de rendre compte des effets des cytokines que nous avons observés pour les deux espèces de rongeurs et, d'autre part, des différences interspécifiques.

Il serait intéressant d'approfondir ces investigations en faisant appel à la technique de culture cellulaire, afin d'étudier les effets à long terme des expositions des cellules B pancréatiques aux cytokines.

## REFERENCES

- [1]- Srikanta J.P., Holqvist S., Spinas G.A., Mandrup-Poulsen T. and Nerup G., "Interaction of  $\beta$ -cell activity and interleukin-1 concentration and exposure time in isolated islets of Langerhans", *Diabetes*, 38, (1989), pp. 1211-1216.
- [2]- Froguel P., "Génétique du diabète non insulino-dépendant (DNID)", *Actual. Diabet. Aron Medica*, (Paris), 27, (1991), pp. 1-11.
- [3]- Gepts W. and Le Copmte P.M., "The pathology of type-1 (juvenile) diabetes", *Am. J. Med.*, 70, (1985), pp. 105-115.
- [4]- Nakhoda A.F., Like A.A., Chapel C.L. and Murray E.T., "The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphological studies", *Diabetes* 26, (1976), pp. 100-112.
- [5]- Fijita T., Yui R., Kumosoto R. and Serizawa Y., "Lymphocytes insulinitis in a non obese diabetic NOD strain of mice": an immunohistochemical and electron microscope investigation", *Biomed. Res.* 9, (1992), pp. 429-433.
- [6]- Oscilewski U., Kiesel U. and Kolb H., "Administration of silica prevents diabetes in BB rats", *Diabetes* 34, (1985), pp. 197-199.
- [7]- Ku L., Pak C.Y., Amano K. and Yoon J.W., "Prevention of lymphocytic thyroiditis and insulinitis in diabetes prone BB rats by the depletion of macrophages", *Diabetologia*, 31, (1988), pp. 400-402.
- [8]- Reich E.P., Janeway C., Rath S. and Shervin R.S., "The islets specific T-cells clones from diabetes NOD mice can cause histological insulinitis", *Diabetes*, 38 (suppl.2), (1989), pp. 1-13.
- [9]- Ellas D., Reshef T., Birk O.S. and Van Der Zee R., "Vaccination against autoimmune mouse diabetes with T-cell epitope of the human 65 Kda heat shock protein", *Proc. Natrl. Acad. Sci. (USA)* 88, (1991), pp. 3080-3093.
- [10]- Like A.A., Biron C.A., Weringer E.G. and Byman K., "Prevention of diabetes in BioBreeding /Worcester rats with monoclonal antibodies that recognize T lymphocytes or natural killer cells", *J. Exper. Med.*, 16664, (1986), pp. 1145-1159.
- [11]- Mandrup-Poulsen T., Bendtzen K., Nerup G. and Egberg J., "Mechanisms of pancreatic islet cell destruction. Dose-dependent cytotoxic effect of soluble blood mononuclear cell mediators on isolated islets of Langerhans", *Allergy*, 41, (1986), pp. 250-259.
- [12]- Sandler S., Andersson A. and Hellerström P., "Inhibitory effects of interleukin-1 on pancreatic (-cells)", *Autoimmunity*, 121, (1987), pp. 1424-1431.
- [13]- Eizirik D.L., "Interleukin-1 induced impairment in pancreatic islet oxidative metabolism of glucose is potentiated by tumor necrosis factor", *Acta endocrinol (Copenh.)*, 119, (1988), pp. 321-325.
- [14]- Palmer J.P., Helqvist S., Spinas G.A., Mandrup-Poulsen T. and Nerup G., "Interaction of (-cell activity and Interleukin-1 concentration and exposure time in isolated rat islets of Langerhans", *Diabetes*, 38, (1989), pp. 1211-1216.
- [15]- Borg L.A.H. and Eizerik D.L., "Short term exposure of rat pancreatic islets of hamman Interleukin-1 increases cellular uptake of calcium", *Immunol. Lett.*, 26, (1990), pp. 253-258.
- [16]- Marquie G., Duhault J. et Jacotot B., "Etude métabolique d'un syndrome diabétique d'ordre nutritionnel chez le rat des sables (*Psammomys obesus*). Un modèle animal du diabète humain de la maturité et de l'obésité", *Bull. Soc. Hist. Natur.* (Alger), (1980), pp. 113-115.
- [17]- Malaise W.J., Like A.A., Malaise-Lagae F. and Cleason R.E., "Diabetes insulin secretion *in vitro* by the pancreas of sand rat (*Psammomys obesus*)", *Diabetes*, 5, (1968), pp. 752-759.
- [18]- Dahmani Y., "Approche biologique d'un modèle expérimental pour l'étude du diabète: le rat des sables (*Psammomys obesus*). Morphologie du pancréas endocrine et le métabolisme de l'adipocyte après un régime hypo- et hypercalorique", Mémoire de Magister, USTHB, Alger (1981).
- [19]- Khalkhal A., "Influence du régime restrictif sur les troubles lipidiques et les complications vasculaires chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) rendu diabétique, stade de la maturité, par un régime hypercalorique enrichi en cholestérol", Mémoire de Magister, USTHB, Alger (1990).
- [20]- Haddar A., "Effets des cytokines sur l'insulinosécrétion *in vitro* chez le rat des sables (normal, obèse et diabétique) et le rat Wistar. Influence du jeûne", Mémoire de Magister, USTHB, Alger (1995).

- [21]-Lacy P.E. and Kostianovsky M.D., "Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas", *Diabetes* 16 (01), (1967), pp. 35-39.
- [22]-Cavaillon J.M., "Les cytokines", Flammarion (Ed.), Paris (1993).
- [23]-Mandrup-Poulsen T., Helqvist S., Molvig J. and Nerup G., "Cytokines as immune effector molecules in autoimmune endocrine disease with special reference to insulin-dependent diabetes mellitus", *Autoimmunity*, 4, (1989), pp. 191-218.
- [24]-Deschaux P.A., "Immunité et physiologie", *Arch. Inter. Physiol. Bioch. Biophys.* (Paris), 101, (1993), pp. 3-8.
- [25]-Spinas G.A., Palmer G.P., Mandrup-Poulsen T. and Andersen H., "The bimodal effect of interleukin-1 on rat pancreatic beta-cells: stimulation followed by inhibition depends upon dose, duration of exposure and ambient glucose concentration", *Acta endocrinologica* (Copenh.), 27, (1988), pp. 307-311.
- [26]-Purrello F. and Buscema M., (1993), "Effects of interleukin-1 on insulin secretion by pancreatic (-cell", *Diab. Nutri. Mutab.*, 6, pp. 2955-304.
- [27]-Corbett J.A., Wang J.L., Misko T. and Langaster J.R., "IL-1 (induces formation of nitric oxide by (-cell purified from rodent islets of Langerhans; evidence for the (-cell as a source and site of action of nitric oxide", *J. Clin. Invest.*, 90, (1992), pp. 2384-2391.
- [28]-Andersen H.U., Jorgensen K.H., Egeberg G., Mandrup-Poulsen T. and Nerup G., "Nicotinamide prevents Interleukin-1 effects on accumulated insulin release and nitric oxide production in rat islets of Langerhans", *Diabetes care* 43, (1994), pp. 770-777.
- [29]-Antoine M.H., Oudraogo R., Segooris J. and Lebrun P., "Hydroxylamine, a nitric oxide donor, inhibits insulin release and activates K<sup>+</sup>ATP channels", *Eur. J. Pharmacol.* 313, (1996), pp. 229-235.
- [30]-Dunger A., Cunningham J.M., Dalaney A.E. and Welsh J.E., "Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma inhibit insulin secretion and causes DNA damage in unweaned rat islets. Extent of nitric oxide involvement", *Diabetologia*, 45, 2, (1996), pp. 183-189.
- [31]-Eiziric D.L., Flodstrom M., Karlens A.E. and Welsh N., "Inducible nitric oxide synthetase and related genes in pancreatic B-cells", *Diabetologia*, 39, 08, (1996), pp. 875-890.
- [32]-Rasschaert J., Deng Y. and Malaise W.J., "Presence of the calcium-sensing receptor in islet  $\beta$ -cells", *Diabetologia*, 41, (1998), pp. 126-140.
- [33]-Squires Pe., Non-Ca<sup>2+</sup> homeostatic functions of the extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing receptor (CaR) in endocrine tissues", *J. endocrinol.*, 165, (2000), pp.173-177.
- [34]-Handler E.S., Mordes J.P., Seals J. and Koevary S., "Diabetes in the BioBreeding/Worcester rat. Induction and acceleration by spleen cell-conditioned media", *J. Clin. Invest.*, 76, (1985), pp. 1113-1139.
- [35]-Rhodes C.J. and Taylor K.W., "Effects of human lymphoblastoid interferon on insulin synthesis and secretion in isolated pancreatic islets", *Diabetologia*, 27, (1984), pp. 601-603.
- [36]-Rabinivith A., Suarez W.L., Thomas P.D. and Strynadka K.N., "Cytotoxic effects of cytokines on rat islets: evidence for involvement of free radicals and lipid peroxidation", *Diabetologia*, 35, (1992), pp. 409-413. □