

میزان اتوآنتی‌بادی ضد گلوتامیک اسید در بیماران دیابتی نوع دو و وابستگان درجه اول آنها

چکیده

آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD) که مسئول تبدیل گلوتامیک اسید به گاما آمینوبوتیریک اسید است یک نوروترانسمیتر مهاری غالب در سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد. پروتئین GAD، ۲ ایزومر مولکولی دارد که وزن مولکولی یکی از آنها ۶۵ کیلودالتون (GAD65) و دیگری ۶۷ کیلودالتون (GAD67) است. ژن GAD۶۵ روی کروموزوم ۱۰ قرار دارد و در سلولهای بتای پانکراس بیان می‌شود. در بیماران IDDM غلظت‌های بالای GADA مشاهده می‌شود و GAD۶۵ نقش مهمی در پیشگویی دیابت IDDM ایفا می‌کند. سنتز این اتوآنتی‌ژن در سلولهای بتا توسط غلظت‌های زیاد گلوکز تحریک شده و افزایش می‌یابد، بنابراین افزایش عملکرد سلولهای جزایر بتای پانکراس سبب افزایش بیان ژن و سنتز پروتئین GAD۶۵ در این سلولها شده و منجر به تولید آنتی‌بادی بر ضد آن می‌گردد (Anti-GAD). در برخی از بیماران مبتلا به دیابت نوع دو میزان Anti-GAD۶۵ افزایش یافته (Anti-GAD مثبت) و بیمار بعد از مدت کوتاهی به انسولین وابسته می‌شود. در این مطالعه میزان آنتی‌بادی ضد گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (Anti-GAD۶۵) در ۵۰ نفر از بیماران دیابتی نوع دو ایرانی و ۳۲ نفر از وابستگان درجه اول آنها و ۵۶ نفر از افراد سالم تعیین و مقایسه گردید. تعیین میزان Anti-GAD با روش ELISA صورت گرفت. میانگین میزان Anti-GAD در افراد سالم $7/01 \pm 6/64$ نانوگرم در میلی‌لیتر و در افراد بیمار $13/59 \pm 10/76$ نانوگرم در میلی‌لیتر و در وابستگان درجه اول آنها $19/71 \pm 22/1$ نانوگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. با در نظر گرفتن Cut off، درصد فراوانی Anti-GAD مثبت در بیماران ۱۸٪ و در وابستگان درجه اول آنها ۲۱/۹٪ بود و هیچ یک از افراد طبیعی، تیترا مثبت Anti-GAD۶۵ را نداشتند. از نظر فراوانی، میزان Anti-GAD مثبت در بیماران نسبت به افراد سالم افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/001$). براساس نتایج که این حالت در وابستگان درجه اول بیماران نسبت به افراد سالم نیز وجود داشت ($P = 0/001$). براساس نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می‌رسد که تخمین میزان Anti-GAD می‌تواند به عنوان یک ابزار مفید در پیشگویی ابتلا به دیابت و وابستگی آن به انسولین به کار گرفته شود.

- I دکتر مهین دخت کیهانی
- II *دکتر محسن فیروززای
- III جمیله قرانلر
- IV دکتر منوچهر نخجوانی

کلیدواژه‌ها: ۱- گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز ۲- آنتی‌بادی ضد GAD۶۵ ۳- دیابت نوع دو
۴- وابستگان درجه اول ۵- ELISA

مقدمه

آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD)، اسید آمینه
اسید گلوتامیک را به γ -آمینو بوتیریک اسید (GABA) تبدیل می‌کند که یک نوروترانسمیتر مهاری غالب در سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد.

- این مقاله تحت حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است (شماره ثبت: ۲۲۳).
- (I) دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران.
 - (II) دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران (*مؤلف مسئول).
 - (III) کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران.
 - (IV) دانشیار بیماریهای غدد و متابولیسم، بیمارستان امام خمینی، خیابان باقرخان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران.

طبق مطالعات انجام شده، اتو آنتی‌بادیهای ضد سلولهای بتای پانکراس چند سال پیش از شروع بیماری قابل تشخیص هستند (Pre-diabetic markers).

Anti-GAD در سرم خون افراد مبتلا به دیابت تا مدتها، بعد از شروع بیماری نیز مشاهده می‌شود اما پیشنهاد شده است که اندازه‌گیری Anti-GAD قبل از شروع بیماری صورت گیرد.

اندازه‌گیری Anti-GAD در مطالعات اپیدمیولوژیکی به آسانی در نمونه سرم افراد با روشهای ELISA و RIA (Radio Immuno Assay) امکان پذیر بوده و این سنجش می‌تواند بطور رضایت بخشی در غربالگری افراد در معرض خطر دیابت، به کار گرفته شود.

اندازه‌گیری Anti-GAD نسبت به سایر اتو آنتی‌بادی‌ها به مراتب آسانتر بوده و برای غربالگری جمعیت‌های بزرگتر، مناسب می‌باشد (۳ و ۷).

این اتو آنتی‌بادی قبل از مرحله وابستگی به انسولین (Pre-insulin deficiency) قابل اندازه‌گیری است (۸).

در کودکان دیابتی، میزان Anti-GAD تا ۳ سال پس از تشخیص بیماری مشابه با سطح آن در زمان شروع بیماری بوده و تغییر نمی‌کند، اما ۶-۷ سال بعد از شروع بیماری، کاهش آن آغاز می‌گردد (۹). به همین دلیل ارزیابی سطح Anti-GAD در دوره پیش دیابتی و قبل از بروز بیماری، بخصوص در وابستگان درجه اول بیماران مبتلا به دیابت در تشخیص زودرس بیماری و غربالگری افراد در معرض خطر، از ارزش بالایی برخوردار می‌باشد.

طبق مطالعات انجام شده، احتمال خطر برای وابستگان دارای Anti-GAD مثبت برای ابتلا به دیابت، در طول ۵ سال آینده، حدود ۵۲٪ می‌باشد (۱۰).

اندازه‌گیری Anti-GAD در دسته‌بندی دیابت NIDDM در مقابل دیابت اتوایمیون دیررس بزرگسالان، در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو و انتخاب روشهای درمانی صحیح و به موقع، از ارزش بالایی برخوردار است.

با توجه به آنکه بیماری دیابت بسیار وابسته به نژاد، شرایط آب و هوایی و رژیم غذایی است، بنابراین در این

پروتئین GAD دارای ۲ ایزومتر مولکولی بوده که وزن مولکولی یکی از آنها ۶۵ کیلودالتون (GAD₆₅) و دیگری ۶۷ کیلودالتون (GAD₆₇) است هر یک از این ایزومرها توسط ژن متفاوتی کد می‌شوند ژن مربوط به GAD₆₇ روی کروموزوم ۲ و ژن مولکول GAD₆₅ که اغلب در بافت عصبی دیده می‌شود روی کروموزوم ۱۰ قرار دارد.

از این دو شکل تنها GAD₆₅ نقش مهمی را در پیشگویی دیابت IDDM ایفا می‌کند.

ساخته شدن این اتو آنتی‌ژن در سلولهای بتای پانکراس، توسط غلظتهای زیاد گلوکز تحریک شده و در سرم افزایش می‌یابد (۱، ۲ و ۳).

طبق بررسیهای انجام شده افزایش عملکرد سلولهای جزایر پانکراس انسانی موجب افزایش بیان ژن و سنتز پروتئین GAD₆₅ در این سلولها می‌شود.

سطح (GAD-Ab) تا حد زیادی تحت تأثیر سن و طول مدت ابتلا به دیابت بوده و میزان آن در افراد مبتلا به دیابت نوع دو حدود ۲۱٪ است (۴).

مشخصه‌های ایمونولوژیکی از جمله Anti-GAD این امکان را فراهم می‌کنند تا در زمانی که مقدار سطح C-پپتید کاهش نیافته و هنوز سلولهای بتای تولید کننده انسولین عمل خود را انجام می‌دهند، احتمال ابتلا به بیماری ارزیابی شود و نیز در افرادی که بیماری در آنها تشخیص داده شده است، نیاز احتمالی آنها به انسولین در آینده مشخص گردد. همچنین این مشخصه‌های ایمونولوژیکی می‌توانند در تصمیم گیری مناسب برای درمان جهت کاهش عوارض و حفظ عملکرد سلولهای بتا در رسیدن به کنترل متابولیکی بهتر اهمیت داشته باشند بخصوص در مورد بیمارانی که عوامل و داروهای خوراکی پایین آورنده قند خون موثر نبوده و درمان تنها در کوتاه مدت مفید است (۴ و ۵).

در واقع ارزیابی Anti-GAD خون در پیشگویی نیاز بیمار مبتلا به دیابت نوع دو به انسولین، طی ۲ تا ۳ سال آینده مفید خواهد بود (۶).

۳ میلی‌لیتر خون جهت تعیین هموگلوبین-گلیکوزیله (HbA_{1c}) در لوله حاوی محلول (۰/۲ سی‌سی) EDTA ۳٪ ریخته می‌شد و ۴ میلی‌لیتر نیز در لوله آزمایش به صورت لخته جمع‌آوری می‌گردید.

پس از سانتریفوژ کردن لوله‌ها به ترتیب پلاسما و سرم آنها جدا می‌شد. سرم به دست آمده جهت انجام آزمایشهای قند خون ناشتا (FBS)، C-پپتید، Anti GAD به ۲ لوله جداگانه منتقل و تقسیم می‌گردید.

از وابستگان درجه اول بیماران و افراد سالم نیز ۴ میلی‌لیتر خون گرفته شد که پس از جدا کردن سرم آنها در ۳ لوله جداگانه جهت انجام آزمایشهای ذکر شده تقسیم گردید.

لوله آزمایش حاوی سرم که برای اندازه‌گیری گلوکز، در نظر گرفته می‌شد در همان زمان جهت اندازه‌گیری قند خون آنالیز می‌شد اما ۲ لوله آزمایش دیگر حاوی سرم، جهت آزمایشهای C-پپتید و Anti GAD در درجه حرارت ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش نگهداری می‌شدند.

- اندازه‌گیری گلوکز: به روش آنزیمی گلوکز اکسیداز توسط دستگاه اتو آنالیزور مدل Mira COBAS و برای هر ۳ گروه پژوهشی صورت گرفت.

- اندازه‌گیری هموگلوبین-گلیکوزیله به روش کالریمتری (Colorimetry): ابتدا از نمونه خون محلول ۵٪ همولیزات تهیه و سپس همولیزات تا انجام مراحل بعدی و تعیین میزان هموگلوبین-گلیکوزیله فریز و نگهداری می‌شد. اندازه‌گیری HbA_{1c} تنها روی نمونه بیماران صورت گرفت.

برای تعیین مقدار هموگلوبین در محلول همولیزات از روش سیانومتهموگلوبین استفاده گردید (۱۲ و ۱۳).

- اندازه‌گیری C-پپتید به روش IRMA: سنجش میزان C-پپتید به روش IRMA توسط کیت Immunotech C-peptide IRMA با Cat#۲۲۲۸ روی نمونه سرم هر ۳ گروه انجام شد (۱۴).

مطالعه سطح آنتی‌بادی ضد GAD در بیماران دیابتی نوع دو ایرانی و وابستگان درجه اول آنها مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی - مقایسه‌ای بیماران در ۳ گروه قرار گرفتند.

گروه اول شامل ۵۰ بیمار (۲۰ مرد و ۳۰ زن) مبتلا به دیابت نوع دو (طبق تعریف WHO) (۱۱) بود که با روش نمونه‌گیری مستمر (Sequential sampling) انتخاب و پس از انجام معاینات و اندازه‌گیری گلوکز سرم خون، HbA_{1c} ، C-پپتید و تشخیص دیابت نوع دو وارد مطالعه شدند.

سن ابتلا در تمام بیماران بالای ۳۰ سال بود و این افراد حداقل به مدت ۶ ماه پس از تشخیص بیماری انسولین دریافت نکرده بودند.

گروه دوم شامل ۳۲ نفر (۱۰ مرد و ۲۲ زن) از وابستگان درجه اول بیماران فوق، شامل خواهر، برادر یا یکی از فرزندان بیمار بود که همراه با بیمار در آزمایشگاه بیمارستان جهت نمونه‌گیری خون، حضور یافته بودند. هیچ یک از افراد وابسته درجه اول، خود مبتلا به دیابت نبودند.

گروه سوم شامل ۵۶ نفر (۲۶ مرد و ۳۰ زن) از افراد سالم بود (گروه کنترل) که دیابتی نبوده و هیچ‌گونه سابقه فامیلی از دیابت در وابستگان درجه اول آنها وجود نداشت. افراد گروه کنترل از نظر جنسیت، سن، BMI (Body Mass Index) با گروه بیمار یکسان انتخاب شدند.

در این تحقیق اطلاعات مربوط به سن، جنس، قد، وزن، BMI، مدت ابتلا به بیماری، سابقه فامیلی و در صورت مثبت بودن سابقه فامیلی در فرد دیابتی، نوع دیابت در وابستگان بیمار، شغل، آدرس، داشتن سابقه فشار خون و هیپرلیپیدمی و ... در فرمهای اطلاعاتی ثبت گردید.

از تمام افراد شرکت کننده در این پژوهش به صورت ناشتا خون گرفته شد که میزان آن در افراد بیمار حدود ۷-۸ میلی‌لیتر بود.

تمام نتایج به دست آمده بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده و سطح معنی‌دار بودن اختلاف، مقدار P کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

نتایج

در این بررسی، میزان اتو آنتی‌بادی بر علیه گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز در بیماران دیابتی نوع دو و وابستگان درجه اول آنها با افراد سالم مقایسه شده است. همچنین درصد افراد دیابتی و وابستگان درجه اول آنها که تیترا مثبت Anti-GAD₆₅ داشتند مشخص گردید که در مقایسه این گروه با افراد سالم، اختلاف معنی‌داری به دست آمد. از ۵۰ بیمار، در ۱۸٪ (۹ نفر) Anti-GAD مثبت و در سایر موارد Anti-GAD منفی بود.

از نظر فراوانی Anti-GAD مثبت بین ۲ گروه بیماران و افراد سالم و وابستگان درجه اول با افراد سالم تفاوت بارز و معنی‌داری وجود داشت (به ترتیب $P < 0/001$ و $P = 0/001$) اما بین بیماران و وابستگان درجه اول آنها از نظر فراوانی Anti-GAD تفاوت، معنی‌دار نبود.

در مقایسه مقادیر FBS، C-پپتید، Anti-GAD بین بیماران و افراد سالم تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (به ترتیب $P < 0/001$ ، $P < 0/001$ و $P = 0/05$) (جدول شماره ۱). ۳۲ نفر از بیماران نیاز به درمان با انسولین داشتند اما در ۲ نفر این نیاز وجود نداشت.

در بیماران با تیترا مثبت Anti-GAD، محدوده سنی ۳۸-۷۵ سال، مدت ابتلا ۱-۱۴ سال و سن شروع بیماری ۳۶-۷۴ سال بود.

۳ نفر از ۹ بیمار با Anti-GAD مثبت، سابقه خانوادگی دیابت داشتند و میانگین Anti-GAD در افراد با تیترا مثبت $10/76 \pm 13/59$ بود.

رابطه بین مقدار Anti-GAD با سن، BMI، سن شروع بیماری، مدت ابتلا HbA_{1c} در افراد با تیترا مثبت Anti-GAD، معنی‌دار نبود (جدول شماره ۱).

- اندازه‌گیری Anti GAD₆₅ به روش الایزا (ELISA Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay):

نمونه سرمهای هر ۳ گروه مورد پژوهش برای اندازه‌گیری Anti-GAD₆₅ به روش الایزا با استفاده از کیت Anti-GADplus No. ۲۰۰۱ Diapletes Anti-GADplus No. ۲۰۳۹ Cat مربوط به شرکت Roche Diagnostics GmbH آلمان مورد سنجش قرار گرفت.

سنجش توسط این کیت دارای حساسیت ۶۹٪ و ویژگی ۹۸٪ می‌باشد.

ضریب تغییرات مربوط به کیت فوق برای ۱۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر برابر با ۳٪ و برای ۳۰ نانوگرم در میلی‌لیتر برابر، ۱۵٪ می‌باشد که بطور میانگین ۹٪ در نظر گرفته می‌شود.

میزان دامنه قابل سنجش Anti GAD توسط کیت، ۱۵۰۰-۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر است.

از نظر تداخل تا کنون هیچ دارو یا متابولیتی شناخته نشده که بر میزان اندازه‌گیری Anti GAD مؤثر باشد و همولیز تا ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تأثیری بر نتایج بررسی ندارد.

جهت تعیین افراد سرم مثبت (Seropositive) و سرم منفی (SeroNegative) از نظر وجود اتو آنتی‌بادی گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز Anti GAD₆₅، سطح Cut off برای مقادیر غیرطبیعی Anti-GAD براساس مقدار میانگین آن در ۵۶ فرد سالم محاسبه و گزارش گردید و OD یا غلظت بیش از میزان Cut off مثبت در نظر گرفته شد:

$$Cut\ off = \text{میانگین کنترل‌های منفی} + 3SD$$

جهت آزمون فرضیات این مطالعه برای مقادیر کمی از آزمون t-student و آنالیز واریانس ANOVA و برای مقادیر کیفی از آزمون Chi-Square و Fisher-Exact test استفاده شد. سپس محاسبات و رسم جدولها و نمودارها با کمک نرم افزار SPSS ۹ (Statistical Package for Social Science) انجام گردید.

جدول شماره ۱- مقایسه متغیرهای مختلف بین افراد بیمار با افراد سالم

مقدار P	افراد سالم (n=۵۶)	افراد بیمار (n=۵۰)	
	۳۰	۳۰	زن (تعداد)
	۲۶	۲۰	مرد (تعداد)
NS	۵۵/۱۴±۱۳/۷۵	۵۷/۵۲±۳/۹۳	سن (سال)
-	-	۹/۹۹±۷/۸۱	مدت ابتلا به بیماری (سال)
-	۴۷/۸۱±۱۲/۴۷	-	سن در زمان شروع بیماری (سال)
NS	۲۶/۲۴±۳/۴۱	۲۵/۶۴±۳/۹۳	BMI (m ^۲ /کیلوگرم)
<۰/۰۰۱	۹۰/۵۲±۹/۶۸	۲۶۷/۸۲±۹۶/۳۷	FBS (میلی گرم/دسی لیتر)
<۰/۰۰۱	۳/۴۰±۱/۵۶	۲/۱۲±۱/۳۶	C-پپتید (نانوگرم/میلی لیتر)
-	-	۱۱/۱۷±۲/۴۲	HbA _{1c} (درصد)
۰/۰۵	**۶/۶۴±۷/۰۱	*۱۰/۷۶±۱۳/۵۹	Anti-GAD (نانوگرم/میلی لیتر)
<۰/۰۰۱	۰	۱۸	فراوانی Anti-GAD مثبت (درصد)

NS=معنی دار نمی باشد. *خطای معیار=۱۲/۶۸-۸/۸۴ نانوگرم در میلی لیتر، **خطای معیار=۵/۷-۷/۵۶ نانوگرم در میلی لیتر

Anti-GAD در ۳ گروه تحت مطالعه تفاوت معنی داری را نشان داد ($P < 0.001$) اما در مورد BMI این تفاوت معنی دار نبود. در مقایسه بیماران با وابستگان درجه اول آنها بین میانگین سنی بیماران ($57/52 \pm 9/68$) و وابستگان درجه اول آنها ($28/75 \pm 9/59$) و نیز بین میانگین قند خون ناشتا در بیماران ($267/82 \pm 96/37$) و وابستگان درجه اول آنها ($89/25 \pm 9/76$) تفاوت شاخص و معنی داری مشاهده گردید ($P < 0.001$) اما از نظر میانگین مقادیر BMI، C-پپتید، Anti-GAD و نیز فراوانی Anti-GAD مثبت در آنها تفاوت معنی داری وجود نداشت (جدول شماره ۳).

در تمام بیماران Anti-GAD مثبت (۹ نفر)، مدت ابتلا زیر ۱۵ سال بوده است. ۲۱/۹٪ از وابستگان درجه اول بیماران Anti-GAD مثبت داشتند (۷ نفر از ۳۲ نفر) و محدوده سنی آنها ۴۵-۱۱ سال و میانگین میزان Anti-GAD، $19/7 \pm 32/2$ نانوگرم در میلی لیتر بود. میانگین میزان FBS در آنها $89/25 \pm 9/76$ و در حد طبیعی بود. مقایسه میانگین مقادیر C-پپتید ($P < 0.001$)، سن ($P < 0.001$) و Anti-GAD ($P = 0.004$) در وابستگان درجه اول با افراد سالم، اختلاف معنی داری مشاهده گردید (جدول شماره ۲). مقایسه میانگین مقادیر C-پپتید، FBS، سن و

جدول شماره ۲- مقایسه متغیرهای مختلف بین وابستگان درجه اول بیماران با افراد سالم

مقدار P	وابستگان درجه اول (n=۳۲)	افراد سالم (n=۵۶)	
-	۲۲	۳۰	زن (تعداد)
-	۱۰	۲۶	مرد (تعداد)
<۰/۰۰۱	۲۸/۷۵±۹/۵۹	۵۵/۱۴±۱۳/۷۵	سن (سال)
NS	۲۵/۸۲±۵/۵۹	۲۶/۲۴±۳/۴۱	BMI (m ^۲ /کیلوگرم)
NS	۸۹/۲۵±۹/۷۶	۹۰/۵۲±۹/۶۸	FBS (میلی گرم/دسی لیتر)
۰/۰۱	۲/۶۰±۰/۵۹	۳/۴۰±۱/۵۶	C-پپتید (نانوگرم/میلی لیتر)
۰/۰۰۴	**۱۹/۷۱±۳۲/۲۱	۶/۶۴±۷/۰۱	Anti-GAD (نانوگرم/میلی لیتر)
۰/۰۰۱	۲۱/۹	۰	فراوانی Anti-GAD مثبت (درصد)

NS=معنی دار نمی باشد. *خطای معیار=۲۵/۴۰-۱۴/۰۲ نانوگرم در میلی لیتر

جدول شماره ۳- مقایسه متغیرهای مختلف بین افراد بیمار و وابستگان درجه اول آنها

مقدار P	وابستگان درجه اول (n=۳۲)	افراد بیمار (n=۵۰)	
	۲۲	۳۰	زن (تعداد)
	۱۰	۲۰	مرد (تعداد)
<۰/۰۰۱	۲۸/۷۵±۹/۵۹	۵۷/۵۲±۱۱/۱۶	سن (سال)
NS	۲۵/۸۲±۵/۵۹	۲۵/۶۴±۳/۹۳	BMI (متر ^۲ /کیلوگرم)
<۰/۰۰۱	۸۹/۲۵±۹/۷۶	۲۶۷/۸۲±۹۶/۳۷	FBS (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)
-	-	۱۱/۱۷±۲/۴۲	HbA _{1c} (درصد)
NS	۲/۶۰±۰/۵۹	۲/۱۲±۱/۳۶	C-پپتید (نانوگرم/میلی‌لیتر)
NS	۱۹/۷۱±۳۲/۲۱	۱۰/۷۶±۱۳/۵۹	Anti-GAD (نانوگرم/میلی‌لیتر)
NS	۲۱/۹	۱۸	فراوانی Anti-GAD مثبت (درصد)

NS=معنی‌دار نمی‌باشد.

بررسی ارتباط میانگین میزان Anti-GAD با متغیرهای سن و میزان FBS با برآورد ضریب همبستگی نشان داد که میزان Anti-GAD در افراد Anti-GAD مثبت با سن، همبستگی منفی معنی‌دار ($r=-0/307, P=0/03$) و با میزان FBS همبستگی مثبت معنی‌داری ($r=0/366, P=0/009$) دارد (نمودار شماره ۱ و ۲).

اندازه‌گیری Anti-GAD به روش الیزا در افراد مبتلا به دیابت نوع دو حساسیت (Sensitivity) ۱۸٪، ویژگی (Specificity) ۱۰۰٪ و دقت (accuracy) ۶۱/۳۲٪ را نشان داد.



نمودار شماره ۱- ارتباط بین میزان Anti-GAD و سن در بیماران دیابتی نوع دو ($r=-0/307, P=0/03$)

تفاوت بین ۲ گروه بیماران با Anti-GAD مثبت و منفی، از نظر سن ($P=0/05$) و میزان Anti-GAD ($P<0/001$) معنی‌دار بود. میانگین سن در افراد با Anti-GAD مثبت پایین‌تر بوده و این گروه از افراد جوانتر بودند اما بین میانگین مقادیر متغیرهای دیگر مانند سن شروع بیماری، مدت ابتلا به بیماری، میزان C-پپتید، FBS، HbA_{1c} تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

از ۵۰ بیمار، ۳۳ نفر از نظر سابقه خانوادگی دیابت مثبت و ۱۷ نفر منفی بودند که میزان فراوانی Anti-GAD مثبت در آنها به ترتیب ۵ نفر (۱۵/۵٪) و ۴ نفر (۲۳/۵٪) بود.

۲ گروه بیماران با سابقه خانوادگی و بدون سابقه خانوادگی دیابت، از نظر سن ($P=0/04$) و سن شروع بیماری ($P=0/05$)، اختلاف معنی‌داری با هم داشتند، بطوری که سن و نیز سن شروع بیماری در افراد دارای سابقه خانوادگی دیابت کمتر بود.

اما تفاوت معنی‌داری در مورد سایر متغیرها از جمله میزان و فراوانی Anti-GAD مثبت، دیده نشد.

در وابستگان درجه اول با Anti-GAD مثبت (۷ نفر) و منفی (۲۵ نفر) تنها تفاوت آماری موجود بین ۲ گروه، میزان Anti-GAD بود ($P<0/001$).

در سایر موارد مانند سن، C-پپتید، FBS و BMI در ۲ گروه تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید.

میزان فراوانی Anti-GAD مثبت در افراد مبتلا به دیابت نوع دو در شرق فنلاند، ۹/۳٪ گزارش شده است (۱۶). این فراوانی در افراد مبتلا به دیابت نوع دو در سنگاپور ۱۶/۱٪ (۱۷)، در استرالیا ۲۴٪ (۵)، در آلمان ۲۱٪ (۱۸)، در ایتالیا ۲۲/۳٪ (۱۹) و در تایلند ۲۵٪ (۲۰) بوده است. بنابراین انجام تست فوق می‌تواند در تشخیص زودهنگام بیماری و انتخاب روش درمانی مناسب کمک کننده باشد.

مطالعات نشان داده‌اند که در ۳۹٪ از بیماران مبتلا به دیابت نوع دو (NIDDM) که وابستگی به انسولین پیدا می‌کنند، این تست مثبت می‌شود (۶).

در این مطالعه هیچ یک از ۵۶ فرد سالم (گروه کنترل) Anti-GAD مثبت نداشتند در حالی که طبق تحقیقات صورت گرفته، ۵-۲٪ از افراد طبیعی می‌توانند دارای Anti-GAD مثبت باشند (۶) اما این تیتراژ مثبت در افراد سالم ناپایدار بوده و علت آن اتوایمیونیتی گذرا نسبت به Anti-GAD می‌باشد (۲۱).

در این مطالعه در تمام بیماران دارای تیتراژ مثبت Anti-GAD (۹ نفر)، مدت ابتلا به بیماری زیر ۱۵ سال بود (جدول شماره ۴) که این موضوع نشان می‌دهد، مدت ابتلای بیماران از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد.

این امر مشابه با سایر گزارشها بود که در آنها به اهمیت میزان Anti-GAD مثبت در تشخیص دیابت نسبت به سایر اتوآنتی‌بادی‌ها اشاره شده است. براساس این گزارشها تا ۱۰ سال پس از شروع بیماری تغییری در سطح Anti-GAD ایجاد نمی‌شود اما پس از این زمان کاهش آن آغاز می‌گردد (۹). بنابراین شاید ضروری باشد تا بیماران در زمان شروع بیماری و قبل از شروع درمان با انسولین (Pre-insulin deficiency) مورد آزمایش قرار گیرند.

۲۱/۹٪ از وابستگان درجه اول بیماران دارای تیتراژ مثبت Anti-GAD بودند که براساس تحقیقات انجام شده صفر تا ۱۰٪ وابستگان بر مبنای استعداد ژنتیکی، Anti-GAD مثبت داشتند (۲۲).



نمودار شماره ۲- ارتباط بین میزان Anti-GAD و FBS در بیماران دیابتی نوع دو ($r=0/366, P=0/009$)

بحث

ارزیابی علائم یا مشخصه‌های ایمونولوژیک، از جمله Anti-GAD اتو آنتی‌بادی‌ها (GADA)، به عنوان یک ابزار مفید در غربالگری و تشخیص زودهنگام بیماری در افرادی که در معرض خطر ابتلا به دیابت قرار دارند و نیز پیشگویی وابستگی به انسولین در بیماران دیابتی نوع دو شناخته شده است (۴، ۸، ۱۵).

در این تحقیق میزان آنتی‌بادی‌های ضد گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (Anti-GAD) در ۵۰ بیمار دیابتی نوع دو که سن همه آنها بالای ۲۰ سال بوده و حداقل ۶ ماه نیاز به انسولین نداشتند و طی این مدت تنها با داروهای پایین آورنده قند خون خوراکی یا با رژیم غذایی درمان می‌شدند و ۲۲ نفر از وابستگان درجه اول آنها اندازه‌گیری و با نتایج حاصل از بررسی ۵۶ فرد سالم مقایسه گردید.

در ۹ نفر (۴ زن و ۵ مرد) Anti-GAD مثبت و در ۴۱ نفر (۲۶ زن و ۱۵ مرد)، Anti-GAD منفی بود. در مطالعه Tuomi و Zimmet، ۲۴/۶۱٪ از افراد دیابتی نوع دو (۱۶/۶۵ نفر) دارای Anti-GAD مثبت بودند (۴).

مطالعه دیگری که در سال ۱۹۹۵ صورت گرفت میزان فراوانی Anti-GAD را در افراد دیابتی غیروابسته به انسولین، ۱۰٪ نشان داد (۱۴).

در جمعیت مورد مطالعه توسط Zimmet و همکاران ۸۷/۵٪ از بیماران دیابتی نوع دو با Anti-GAD مثبت، انسولین دریافت می‌کردند که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد(۴).

با توجه به درصد بالای افراد نیازمند به انسولین در بین کسانی که Anti-GAD در آنها مثبت می‌باشد، غربالگری و تشخیص زودرس بیماران قبل از مرحله وابستگی به انسولین ضروری به نظر می‌رسد.

Zimmet و همکاران میزان فراوانی Anti-GAD مثبت در بیماران دیابتی نوع دو تحت درمان با انسولین (ITDM) را ۷۳/۳٪ و در افراد بیمار غیر نیازمند به انسولین ۴/۳٪ نشان دادند.

تحقیقات انجام شده در سال ۱۹۹۷ در تایلند، میزان فراوانی Anti-GAD مثبت در افراد بیمار ITDM را ۲۵٪ گزارش کرد(۲۰).

طبق بررسیهای صورت گرفته در سال ۱۹۹۹ نیز فراوانی Anti-GAD مثبت در بیماران دیابتی نوع دو نیازمند به انسولین، ۳/۸٪ بوده است(۲۳).

در ۲ گروه از بیماران نیازمند به انسولین و غیر نیازمند به انسولین در این مطالعه، بین میانگین مقادیر $FBS(P=0/003)$ ، $HbA1c(P=0/009)$ ، $C\text{-پپتید}(P=0/02)$ و مدت ابتلا به بیماری ($P=0/05$) تفاوت معنی‌داری وجود داشت و در بیماران دیابتی نوع دو نیازمند به انسولین (ITDM)، مدت ابتلا به بیماری و میزان C-پپتید پایین‌تر و در مقابل، FBS و $HbA1c$ بالاتر بود.

اما از نظر میزان Anti-GAD و فراوانی Anti-GAD مثبت، سن، سن شروع دیابت و BMI تفاوت معنی‌داری بین ۲ گروه دیده نشد.

نتایج حاصل از مطالعات Zimmet و همکاران نیز نشان داد که میزان C-پپتید سرمی در افراد بیمار مبتلا به دیابت نوع دو و تحت درمان با انسولین، نسبت به افرادی که انسولین دریافت نمی‌کنند، پایین‌تر است ($P<0/001$)(۴).

طی تحقیقات انجام شده در ایتالیا نیز میزان C-پپتید با انسولین درمانی، رابطه معنی‌داری داشت ($P<0/001$)(۱۴).

در این مطالعه علت بالا بودن تعداد وابستگان درجه اول بیمارانی که دارای Anti-GAD مثبت بودند را می‌توان به بالا بودن میانگین سنی ($28/75 \pm 9/59$) در این افراد نسبت به سایر مطالعات نسبت داد زیرا اغلب وابستگان درجه اول بیماران تحت مطالعه را فرزندان آنها تشکیل می‌دادند، در حالی که در بررسیهای صورت گرفته، احتمال ابتلای خواهر یا برادر یک فرد دیابتی به این بیماری ۱۰-۳٪ و احتمال ابتلای فرزند یک فرد دیابتی (دارای پدر یا مادر دیابتی و یا هر دو آنها) ۲۰-۵٪ می‌باشد(۲۲).

در نهایت می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که وابستگان درجه اول بیماران تحت مطالعه نیز به دلایل ژنتیکی، مانند پدر و مادر خود دارای نوعی دیابت دیررس بزرگسالان با روند خود ایمنی می‌باشند که دارای سرعت پیشرفت آهسته‌ای بوده و در سن بالاتری خود را نشان می‌دهد.

بنابراین از این آزمون می‌توان به عنوان یک تست پیشگویی کننده در تشخیص زودهنگام بیماری و غربالگری افراد مستعد ابتلا به دیابت از جمله وابستگان درجه اول بیماران استفاده کرد.

طبق مطالعات انجام شده، احتمال خطر ابتلا به دیابت در وابستگان درجه اول بیماران دارای Anti-GAD مثبت در طول ۵ سال آینده حدود ۵۲٪ می‌باشد(۱۰).

یکی از مهمترین کاربردهای این آزمون، در بیماران دیابتی نوع دو، پیشگویی وابستگی بیمار به انسولین در آینده می‌باشد. زیرا طبق گزارشهای موجود حدود ۳۹٪ از افراد دیابتی نوع دو (غیروابسته به انسولین) که مدتی وابستگی به انسولین پیدا کردند، دارای تیتر مثبت Anti-GAD بودند(۶).

در این مطالعه از ۹ بیمار دارای Anti-GAD مثبت، ۷ نفر (۷۷/۸٪) تحت درمان با انسولین بودند و ۲ نفر (۲۲/۲٪) نیاز به درمان با انسولین پیدا نکردند که این مطلب پیشرفت روند تخریب سلولهای β را در این افراد نشان می‌دهد در حدی که موجب کاهش ترشح انسولین و انسولین درمانی گردیده است.

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه اندازه‌گیری اتو آنتی‌بادی ضد گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (Anti-GAD) می‌تواند به عنوان یک مشخصه ایمونولوژیکی در غربالگری افراد در معرض خطر ابتلا به دیابت، بخصوص وابستگان درجه اول بیماران دیابتی و نیز در پیشگویی وابستگی به انسولین در بیماران دیابتی نوع دو به کار برده شود تا هر چه سریعتر درمان مناسب جهت اداره صحیح بیماری و جلوگیری از مشکلات و عوارض این بیماری که به عنوان شایعترین بیماری هورمونی شناخته شده است، صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی و نیز همکاری همکاران دفتر پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران صورت گرفت.

انجام برخی از آزمایشها و تهیه نمونه‌ها نیز بدون همکاری و حمایت پرسنل بیمارستان امام خمینی (ره) و ولیعصر و بویژه آزمایشگاه بخش غدد امکان‌پذیر نبود.

در تمام مراحل انجام تحقیق تایپ مطالب به عهده سرکار خانم تیمسار بود که جا دارد از تمام افرادی که در انجام طرح و انتشار مقاله با مجریان آن همکاری نموده‌اند قدردانی و تشکر به عمل آید.

منابع

- 1- Bjork E. Glucose regulation of the autoantigen GAD 65 in human pancreatic islets, *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 75(6): 1574-6.
- 2- Mitoma H., Song SY., Ishida K., Yamakuni T., Kobayashi T., Mizusawa H. Presynaptic impairment of cerebellar unihibitory synapses by an autoantibody to glutamate decarboxylase, *J Neurol Sci*, 2000, 175(1): 40-4.
- 3- Baekkeskov A., Stoot H., Christgau S., Reetz A., Solimena M., Coseatho M., et al. Identification of new autoantigen in insulin dependent diabetes as the GABA synthetizing

بیش از نیمی از بیماران دارای تیتراژ مثبت Anti-GAD (ه نفر از ۹ نفر)، سابقه خانوادگی دیابت داشتند که این موضوع اهمیت زمینه ژنتیکی افراد را بیشتر آشکار می‌سازد. ۸۸/۸۹٪ از افراد با Anti-GAD مثبت در گروه‌های سنی ۶۰-۳۰ سال قرار داشتند. همچنین مقایسه بین ۲ گروه از بیماران دارای Anti-GAD مثبت و بیماران Anti-GAD منفی، نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میانگین سنی گروه بیمار (۵۱/۱۱±۱۱/۴۶) در مقابل (۵۸/۹۲±۱۰/۷۲) وجود دارد (P=۰/۰۵) و افراد دارای Anti-GAD مثبت جوانتر می‌باشند که این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعه Br uno در سال ۱۹۹۹ مطابقت دارد (۱۹).

۲۱/۹٪ از وابستگان درجه اول بیماران تحت مطالعه تیتراژ مثبت Anti-GAD داشتند و ۲۵ نفر دارای Anti-GAD منفی بودند.

بین ۲ گروه از وابستگان درجه اول با Anti-GAD مثبت و منفی از نظر سن و میانگین میزان Anti-GAD، تفاوت معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۰۱). همچنین ارتباط معنی‌داری بین میزان Anti-GAD با مقادیر سن (r=-۰/۳۰۷، P=۰/۰۳) و میزان قند خون ناشتا (r=۰/۳۶۶، P=۰/۰۰۹) در بیماران مطالعه شده مشاهده گردید بطوری که افزایش مقدار Anti-GAD در بیماران با کاهش سن و افزایش FBS همراه بود (نمودارهای شماره ۱ و ۲).

بین میزان Anti-GAD در ۲ گروه بیمار و سالم (P=۰/۰۵) و نیز بین فراوانی تیتراژ مثبت Anti-GAD در ۲ گروه، تفاوت معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۰۱).

مقایسه میانگین بین میزان Anti-GAD در ۲ گروه، تفاوت معنی‌داری را نشان داد (به ترتیب P=۰/۰۱ و P=۰/۰۰۴). رابطه فراوانی Anti-GAD مثبت در ۲ گروه وابستگان و افراد طبیعی نیز معنی‌دار بوده است (P=۰/۰۰۱). در نتیجه ۲ گروه بیماران دیابتی نوع دو و وابستگان درجه اول آنها در این مطالعه از نظر میزان و فراوانی Anti-GAD در مقایسه با افراد سالم، تفاوت معنی‌داری داشتند که این امر می‌تواند بیانگر شروع روند اتوایمیون در افراد فوق باشد.

- 13- Peacock J., Glycosylated haemoglobin: measurement and clinical use, *Journal of clinical pathology*, 1984, 37: 841-851.
- 14- Gambelungle G., Forini F., Laureti S., Murdolo G., Toraldo G., Santeusanio F., et al. Increased risk for endocrine autoimmunity in Italian type 2 diabetic patients with GAD65 autoantibodies, *Clin Endocrinol Oxf*, 2000, 52(5): 565-73.
- 15- Pflutzner A., Harzer O., Kunt T., Forst T., Abdollahnia N., Lobig M., et al. Comparison of immunoassays for the detection of Anti-GAD65 autoantibodies in patients with diabetes mellitus, *Clin Lab*, 2000, 46(5-6): 275-9.
- 16- Tuomi T., Carlsson A., Li H., Isomaa B., Miettinen A., Nilsson A., et al. Clinical and genetic characteristics of type 2 diabetes with and without GAD antibodies, *Diabetes*, 1999, 48(1): 150-7.
- 17- Thai AC., Ng WY., Loke KY., Lee WRW., Lui KF., Cheah LS. Anti GAD antibodies in chinese patients with youth and adult-onset IDDM and NIDDM, *Diabetologia*, 1997, 40: 1425-1430.
- 18- Schiel R., Muller UA. GAD autoantibodies in a selection free population of insulin-treated diabetic patients: indicator of a high prevalence of LADA? *Diabetes Research and clinical practice*, 2000, 49: 33-40.
- 19- Bruno G., De-Satvia A., Arcari R., Borra M., Grosso N., Carta Q., et al. Clinical immunological and genetic heterogeneity of diabetes in an Italian population-based cohort of lean newly diagnosed patients aged 30-54 years. Piedmont study Group for Diabetes Epidemiology, *Diabetes Care*, 1999, 22(1): 50-5.
- 20- Rattarasarn C., Aguilar DM., Soontharnpun S. Glutamic acid decarboxylase antibodies in non-insulin dependent diabetes patients with secondary sulfonylurea failure in thailand, *Diabetes Res Clin Pract*, 1997, 37(3): 193-7.
- 21- Roll U., Christie MR., Standl E., Ziegler AG. Associations of Anti-GAD antibodies with Islet cell antibodies and Insulin Autoantibodies in First-degree relatives of type 1 diabetic patients, *Diabetes*, 1994, 43: 154-159.
- enzyme glutamic acid decarboxylase, *Nature*, 1990, 347: 151-156.
- 4- Zimmet PZ., Tuomi T., Mackay IR., Rowley MJ., Knowles W., Chohen M., et al. Autoimmune diabetes mellitus in adults(LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency, *Diabetic medicine*, 1994, 11: 299-302.
- 5- Willis J., Scott R., Brown L., Zimmet P., Mackay I., Rowely M. Type 1 diabetes in insulin-treated adult-onset diabetic subjects, *Diabetes Res Clin Pract*, 1998, 42(1): 49-53.
- 6- Tuomilehto J., Zimmet P., Machay R. Antibodies to glutamic acid decarboxylase as predictors of insulin dependent diabetes mellitus before clinical onset of disease, *Lancet*, 1994, 343(8910): 1383-5.
- 7- Zimmet P., Shaten BJ., Kuller LH., Rowley MJ., Knowles WJ., Mackay IR. Antibodies to glutamic acid decarboxylase and diabetes mellitus in the Multiple Risk Factor Intervention Trial, *Am J Epidemiol*, 1994, 140(8): 683-90.
- 8- Solimena M., Decamilli P. Autoimmunity to glutamic acid decarboxylase(GAD) in stiff-Man syndrome, *Neurosci*, 1991, 14: 452-57.
- 9- Hagopian WA., Kartsen AE., Gottsater A., Olsson M., Grubin CE., Michelsen A., et al. Quantitative assay using recombinant human islet glutamic acid decarboxylase (GAD 65) shows that 64k autoantibody positivity at onset predicts diabetes type, *J Clin Invest*, 1993, 91: 368-374.
- 10- Roll U., Ziegler AG. Combined antibody screening for improved prediction of IDDM-modern strategies, *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997, 105: 1-14.
- 11- Barnett P., Braunstein GD. Diabetes mellitus. In: Andreoli, carpenter, Griggs(eds). Cecil essentials of medicine, Fifth ed., Loscalzo USA, WB Saunders Company, 2001, PP: 583-98.
- 12- Goldstein DE., Little RP., Wiedmeger HM., England JD., Mckenzie EM. Glycated hemoglobin: Methodologies and clinical application,s, *Clinical Chemistry*, 1986, 32(10): B64-B70.

۲۲- کیهانی - مهین‌دخت، نخجوانی - منوچهر، نقش اتو آنتی‌بادی GAD₆₅ در دیابت ملیتوس (نوع یک) و وابستگان درجه اول آنها و مقایسه آن با افراد سالم، مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، ۱۳۸۰، سال پنجاه و نهم (شماره ۱)، صفحه: ۲۵-۲۱.

23- Zimmet P., Turner R., Mccarty D., Rowley M., Mackay I., Crucial points at diagnosis, Type 2 diabetes or slow type 1 diabetes, Diabetes care, 22 supplement 2, 1999, B59-64.

ANTI-GAD AUTOANTIBODY LEVELS IN TYPE II DIABETES PATIENTS AND THEIR FIRST DEGREE RELATIVES

^I M. Keyhani, PhD *^{II} M. Firoozrai, PhD ^{III} J. Gharanlar, MSc ^{IV} M. Nakhjavan, MD

ABSTRACT

Glutamic Acid Decarboxylase(GAD) catalyses the conversion of glutamic acid to Gama amino Butyric Acid(GABA) which is one of the major inhibitory neurotransmitters in central nervous system. GAD has two isoforms with molecular weights of 65 Kda(GAD 65) and 67 Kda (GAD 67). GAD 65 gene is located on chromosome 10 and expressed in β -cells of pancreas. The presence of high concentrations of Anti-GAD Antibodies(GADA) in serum of patients with IDDM is evident. Evaluation of GADA levels in individuals with NIDDM and their first degree relatives can also be used as a predictor of late insuline dependency. High concentrations of glucose induce the production of GAD 65 in β -cells which is associated with an increase in GAD 65 gene expression. It has been shown that patients with NIDDM may produce higher levels of GADA and after short period of time developing IDDM. In the present study anti-GAD levels were determined and compared in 50 type II Iranian diabetic patients, in 32 of their first degree relatives and in 56 healthy subjects. The evaluation of GADA levels were carried out by the use of ELISA method. The mean level of anti-GAD in the healthy subjects was 6.64 ± 7.01 ng/ml, in the patients was 10.76 ± 13.59 ng/ml and in their first degree relatives was 19.71 ± 32.1 ng/ml. In regard to the cut off, 18% of patients had seropositive anti-GAD and 21.9% of their first degree relatives had seropositive anti-GAD but all of the healthy subjects had seronegative anti-GAD. The frequencies of anti-GAD positivity in patients and their first degree relatives compared with that of healthy subjects were significantly higher ($P < 0.001$ and $P = 0.001$ respectively). It can be concluded that the determination of anti-GAD in healthy subjects and their first degree relatives of type II diabetic patients can be used to predict the development of diabetes and insuline dependency.

Key Words: 1) Glutamic Acid Decarboxylase 2) Anti-GAD 65 autoantibodies 3) Type II diabetes
4) First degree relatives 5) ELISA

This research is conducted under financial support of undersecretary research of Iran University of Medical Sciences and Health Services.

I) Associate Professor of Biochemistry. Faculty of Paramedicine, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

II) Associate Professor of Biochemistry. Faculty of Paramedicine, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran. (*Corresponding author).

III) MSc in Biochemistry. Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

IV) Associate Professor of Endocrinology and Metabolism, Imam Khomeini Hospital, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.