

بررسی وجود اتوآنتی‌بادی ضد آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز در بیماران دیابتی نوع ۱ و وابستگان درجهٔ یک آنها و مقایسهٔ آن با افراد سالم

محبوبه ندری، دکتر محمود جلالی، دکتر علی‌اکبر صبور، دکتر محمود جدی تهرانی، دکتر احمد رضا درستی

چکیده

مقدمه: گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD) آنزیم کاتالیزکنندهٔ واکنش تبدیل گلوتامیک اسید به گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) است که ایزو آنزیم ۶۵ کیلودالتون آن در سلول‌های بنا جزاً پانکراس وجود دارد. در دورهٔ قبل از دیابت بالینی و طی تخریب سلول‌های بنا این اتوآنتی‌ژن آزاد شده اتو آنتی‌بادی‌های آن در سرم پدیدار می‌شوند. حداقل ۱۰ سال قبل از پیدایش علایم بالینی دیابت ICAS (Islet Cell Auto antibodies) را می‌توان در سرم افراد بیمار دیابتی یافت. از جمله این اتوآنتی‌بادی‌ها اتوآنتی‌بادی ضد گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (anti-GAD) است که زودتر از سایر اتوآنتی‌بادی‌ها در سرم ظاهر می‌گردد و نشانگر مهم و مفیدی در پیش‌بینی ابتلاء به دیابت خصوصاً در وابستگان درجهٔ یک بیماران است و از این جهت در اتخاذ تدابیر درمانی پیشگیرانه حائز اهمیت است. به منظور تعیین و مقایسهٔ مقادیر اتوآنتی‌بادی anti-GAD، این مطالعه روی بیماران دیابتی نوع ۱، وابستگان آنان و افراد سالم انجام گرفت. مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر یک مطالعه مورد - شاهدی است که با روش نمونه‌گیری تصادفی بر روی ۵۰ بیمار دیابتی نوع ۱ با میانگین سنی $12/24\pm 6/2$ سال و با میانگین مدت ابتلاء $34/5\pm 8/4$ ماه و ۳۵ نفر از وابستگان درجهٔ یک بیماران و ۵۰ فرد سالم بدون سابقهٔ ابتلاء فردی یا خانوادگی به دیابت که از لحاظ سن و جنس با گروه بیمار یکسان انتخاب شده بودند، صورت گرفت. مقدار قند خون ناشتا (FBS) در گروه وابستگان بیماران و افراد سالم اندازه‌گیری و طبیعی بودن آن محرز گردید. مقدار anti-GAD در سرم هر سه گروه بیماران، وابستگان بیماران و افراد سالم به روش الیزا (ELISA) اندازه‌گیری شد. یافته‌ها: بین مقدار anti-GAD در دو گروه مورد با میانه و دامنهٔ $(5-270)$ μ M، همچنین بین مقدار anti-GAD شاهد با میانه و دامنهٔ $(0-10)$ μ M در میلی لیتر تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده شد ($p < 0.001$). در گروه وابستگان بیماران با میانه و دامنهٔ $(0-95)$ ng/mL بین مقدار میانگین سن (سال) و مدت ابتلاء (ماه) در دو گروه از بیماران با تیترهای مثبت و منفی تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده شد ($p < 0.05$). بین میزان آنتی‌بادی و سن بیماران، مدت ابتلاء به بیماری و سن شروع بیماری رابطهٔ منفی وجود داشت (به ترتیب -0.036 ، -0.036 ، -0.036). نتیجه‌گیری: از آنجا که مقادیر anti-GAD در بیماران دیابتی نوع ۱ و وابستگان این بیماران افزایش معنی‌دار دارد، اندازه‌گیری anti-GAD شاخص مهمی در شناسایی و تشخیص بیماران در مرحلهٔ قبل از دیابت بالینی است.

واژگان کلیدی: گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD)، anti-GAD، دیابت، ICAS

دریافت مقاله: ۸۴/۲/۵ - دریافت اصلاحیه: ۸۴/۷/۱۶ - پذیرش مقاله: ۸۴/۷/۱۶

مقدمه

واکنش دهنده با آنتی بادی های ناشی از تخریب اتوایمیون سلول های بتای پانکراس مولد انسولین مورد توجه خاص قرار گرفته است، توجه خاص روی آنژیم GAD65 پانکراسی است که آنتی ژنیستیتیو قوی در مقابل آنتی بادی ایجاد شده در بیماری دیابت دارد^۱ همچنین افزایش بیش از حد این آنژیم با کاهش سطح گلوتامات همراه است که به نوبه خود سبب کاهش اگزوسیتیز انسولین و گلوکاگون از گرانول های ترشحی می گردد.^۲ خطر ابتلا به دیابت نوع ۱ وابسته به تعداد و مقدار آنتی بادی هایی است که در سرم بیماران دیابتی وجود دارند. از جمله این اتوآنتی بادی ها اتوآنتی بادی ضد گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز است، anti-GAD در سرم ۹۰٪ از بیماران دیابتی تازه مبتلا شده یافت شده است.^۳ این آنتی بادی در بیماران در دوره پیش دیابت^۴ نیز یافت می شود به ویژه در اقوام درجه یک بیمارانی که استعداد ژنتیک ابتلا به بیماری دارند، فرمول ژنوتیپی HLA DR3/DR4 و نیز فرمول ژنوتیپی HLA DQA1/HLADQB1 با بیماری دیابت مرتبط است.^۵ اتوآنتی بادی ضد گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز زودتر از سایر عوامل ICA در سرم ظاهر می شود و نسبتاً پایدار است. وجود آن قبل از دیابت بالینی قریب الوقوع بودن آغاز آن را نشان می دهد و یکی از بهترین آزمون های غربالگر و پیشگویی کننده ابتلا به دیابت است.^۶ بیان anti-GAD عنصر اساسی در پاتوژنی دیابت نوع ۱ است و برای ایجاد بیماری در موش های NOD ضرورت دارد. نبودن این آنژیم باعث بلوک شدن سلول های T دیابتی و تضعیف پاسخ به سایر اتوآنتی بادی ها می شود.^۷

در دو دهه اخیر مطالعات زیادی بر روی میزان anti-GAD صورت گرفته است که همگی به اهمیت وجود و میزان این اتوآنتی بادی در سرم بیماران و واپستکان درجه یک آنها اشاره کرده اند.^{۱۳-۲۱} همچنین مطالعاتی در این زمینه در ایران انجام شده است که نتایج آن مؤید نقش مهم anti-GAD در ارتباط با بیماری دیابت است.^{۲۲-۲۴} مطالعه حاضر با هدف بررسی وجود اتوآنتی بادی ضد گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز در بیماران دیابتی نوع ۱ و واپستکان درجه یک آنها و مقایسه آن با افراد سالم انجام شد.

دیابت شایعترین بیماری غدد درون ریز است که شیوع روزافزونی در جهان دارد. طبق آمار سازمان جهانی بهداشت در سال ۱۹۹۷، ۱۲۴ میلیون نفر در جهان مبتلا به دیابت گزارش شدند که این رقم تا سال ۲۰۲۵ به ۳۰۰ میلیون نفر خواهد رسید.^۱ مطالعات اپیدمیولوژیک دلالت بر توزیع متغیر دیابت در ایران دارد. مطالعات، میزان شیوع را در مناطق مرکزی و حاشیه بیابان های مرکزی حدود ۱۶/۳٪ و در جنوب حدود ۱۳/۶٪ نشان می دهد.^۲ دیابت نوع یک که کل موارد دیابت را تشکیل می دهد،^۳ پیامد یک فرایند اتوایمیون است که منجر به تخریب پیشرونده سلول های بتای پانکراس می شود در حدی که درمان جایگزینی با انسولین اجتناب ناپذیر می شود. بیماری زمانی ظهور بالینی می یابد که حدود ۸۰-۸۵٪ سلول های بتا تخریب شده است. نشانگرهای ایمنولوژیک، پیشگویی بیماری را طی مراحل قبل از ظهور علیم بالینی بیماری ممکن می سازند.^۴ حداقل ۱۰ سال قبل از شروع دیابت نوع ۱ ممکن است آنتی بادی های ضد سلول های بتای پانکراس در سرم بیماران ظاهر شوند. این عوامل شامل آنتی بادی هایی بر ضد انسولین (IAA)، ضد گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (anti-GAD) و ضد پروتئین IA₂ است.^۵ مهمترین این اتوآنتی بادی ها anti-GAD است. اتوآنتی ژن گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز یک مولکول پروتئینی با وزن ملکولی ۶۵۰۰۰ دالتون است که در سلول های بتای جزایر پانکراس وجود دارد و در اثر تخریب سلول های بتا به مرور زمان این پروتئین آزاد و اتوآنتی بادی های آن در سرم ظاهر می شوند.^۶ گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (EC.1.1.15) آنژیمی است که GABA را از گلوتامیک اسید کاتالیز می کند، این آنژیم دارای دو ایزو آنژیم ۶۵ و ۶۷ کیلو دالتونی است که در سلول های پانکراس نوع ۶۵ کیلو دالتون آن (GAD65) وجود دارد. GAD65 در وزیکول های سیناپسی نورون ها و میکرووزیکول های شبکه سیناپسی سلول های بتا قرار دارد و توسط ژن GAD2 بر روی کروموزوم شماره ۱۰ بیان و سنتز می شود. GAD67 توسط ژن GAD1 بر روی کروموزوم شماره ۲ بیان می شود. این آنژیم در مغز، پانکراس، غده آدرنال، دئودنوم، لوله های فالوب، کیسه صakra، عضله، تیروئید، تیموس و بیضه یافت می شود.^۷ نقش فیزیولوژیک آنژیم GAD به عنوان یک اتوآنتی ژن

یافته‌ها

در این مطالعه ۵۰ بیمار مورد بررسی شامل ۲۱ پسر (۴۲٪) و ۲۹ دختر (۵۸٪) دختر بودند. میانگین سنی آنان 22.4 ± 6.2 سال و دامنه آن ۳۰ سال تا $1/5$ ماه بود. میانگین سن شروع بیماری آنان 9.5 ± 5.8 سال و میانگین مدت ابتلا 3.4 ± 5.8 ماه بود. ۲۵ نفر از وابستگان درجه یک بیماران شامل ۱۸ دختر (۵۱٪) و ۱۷ پسر (۴۸٪) مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی افراد این گروه 9.1 ± 7.8 سال و دامنه آن ۲-۳۴ سال بود. ۵۰ فرد سالم (گروه شاهد) شامل ۲۱ پسر (۴۲٪) و ۲۹ دختر (۵۸٪) در این مطالعه مشارکت داشتند که از جهت سن و جنس با گروه بیماران یکسان انتخاب شده بودند (جدول ۱).

از ۵۰ فرد بیمار ۱۸ نفر (۳۶٪) تیتر anti-GAD مثبت (۶۸٪ ± 8.8 /۱۶ نانوگرم در میلی لیتر) و ۲۲ نفر (۶۴٪) تیتر anti-GAD منفی داشتند (18.8 ± 7.9 نانوگرم در میلی لیتر). از ۳۵ فرد وابسته بیمار ۱ نفر (۲٪) anti-GAD مثبت (۵۰٪) نانوگرم در میلی لیتر) و ۲۴ نفر anti-GAD منفی داشتند (4.9 ± 2.1 نانوگرم در میلی لیتر). افراد سالم همگی از جهت اتوآنتی‌بادی ضد گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز منفی بودند. غلظت سرمی anti-GAD در گروه بیماران با میانه و دامنه برابر (5.27 ± 0.00) نانوگرم در میلی لیتر و در گروه شاهد با مقادیر (10.0 ± 0.0) نانوگرم در میلی لیتر به دست آمد. که با $p < 0.0001$ تفاوت به شدت معنی‌داری را نشان می‌دهد. غلظت سرمی anti-GAD در گروه وابستگان درجه یک بیماران با مقادیر (9.5 ± 0.0) نانوگرم در میلی لیتر و گروه شاهد با مقادیر (10.0 ± 0.0) نانوگرم در میلی لیتر تفاوت آماری معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p < 0.01$). از ۱۸ فرد anti-GAD مثبت ۸ نفر پسر (۴۴٪) و ۱۰ نفر (۵۵٪) دختر بود. از ۲۲ فرد anti-GAD منفی، ۱۲ نفر (۵۴٪) پسر و ۱۰ نفر (۴۵٪) دختر بودند، که بین دو جنس از جهت وجود اتوآنتی‌بادی اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. از ۵۰ فرد مورد بررسی ۱۸ نفر (۳۶٪) دارای سابقهٔ فامیلی anti-GAD ابتداء به دیابت بودند. ۱۱ نفر (۲۲٪) از بیماران

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر با روش نمونه‌گیری تصادفی از بیماران مراجعه کننده به مرکز طبی کودکان و وابستگان درجه یک آنها در سال ۱۲۸۲-۸۳ انجام شد. بیماران با توجه به نتایج آزمایش‌های مبتنی بر افزایش غیرطبیعی میزان قندخون و کاهش انسولین و نیز علایم بالینی مانند لاغری، پرادراری و پرنوشی از نظر متخصصان غدد مبتلا به دیابت نوع ۱ تشخیص داده شده بودند. بیماران دیابتی نوع ۱ و وابستگان درجه یک آنها پس از توجیه و کسب موافقت برای همکاری انتخاب شدند. مشخصات آنها شامل سن، جنس، سابقهٔ ابتلا به بیماری‌های مختلف، سابقهٔ فامیلی ابتداء به دیابت، مدت ابتلا به دیابت بررسی و ثبت شد. بیمارانی که سابقهٔ ابتلا به بیماری‌های نورولوژیک یا اتوایمیون داشتند از مطالعه حذف شدند. افراد سالم (گروه شاهد) نیز از نظر سن و جنس با گروه بیمار یکسان انتخاب شده هیچ‌کدام سابقهٔ ابتلای فردی یا خانوادگی به دیابت نداشتند. از همهٔ بیماران ($n=50$)، وابستگان درجه یک آنها ($n=25$) و افراد سالم ($n=50$) میلی‌لیتر خون وریدی گرفته شده نمونه‌های سرم در ویال‌های جداسازی تقسیم شده تا زمان انجام آزمایش در دمای 70°C -درجه سلسیوس نگهداری شد. گلوکز ناشتای خون (FBS) وابستگان درجه یک بیماران و افراد سالم به روش آنزیماتیک اندازه‌گیری شد، مقدار اتوآنتی‌بادی ضد گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز در سرم کلیه افراد مورد بررسی به روش الیزا (ELISA) و با استفاده از کیت ساخت Roche Diagnostic GmbH کیت دارای حساسیت ۶۹٪ و ویژگی ۹۸٪ CV. مربوط به آن برای 1500 نانوگرم در میلی لیتر $\frac{1}{2}$ ٪ و برای 30 نانوگرم در میلی لیتر 15% و به طور متوسط 9% است. برای تعیین افراد anti-GAD+ از سطح anti-GAD cut-off کیت استفاده و نتایج محاسبه و گزارش شد. جهت آزمون فرضیات این پژوهش برای مقادیر کمی از آزمون t و آزمون من ویتنی یو و آزمون همبستگی پیرسون و برای مقادیر کیفی از آزمون مریع کای و نیز آزمون دقیق فیشر استفاده شد. نتایج به دست آمده بر حسب میانگین \pm انحراف معیار و سطح معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در p -value کمتر از ۵٪ تعریف شد.

جدول ۱- ویژگی‌های افراد در سه گروه مورد مطالعه

شاهد	وابسته بیمار	مورد	
۵۰	۲۵	۵۰	تعداد افراد
۲۹	۱۸	۲۹	دختر (نفر)
۲۱	۱۷	۲۱	پسر (نفر)
۱۲/۲(۶/۲)	۱۹/۹(±۷/۸)	۱۲/۲ (±۶/۲)*	سن (سال)
-	-	۹/۵(±۵/۸)*	سن شروع بیماری (سال)
-	-	۳۴/۵(±۸/۴)*	مدت ابتلا (ماه)

* اعداد بر حسب (انحراف معیار ±) میانگین بیان شده‌اند.

جدول ۲- ویژگی‌های بیماران anti-GAD مثبت و منفی

آنتی بادی منفی	آنتی بادی مثبت	
۳۲	۱۸	تعداد بیماران
۱۹	۱۰	دختر (نفر)
۱۳	۸	پسر (نفر)
۱۱	۷	با سابقه ابتلای خانوادگی
۲۱	۱۱	بدون سابقه ابتلای خانوادگی
۳	۱	با سابقه ابتلای به بیماری قبلی
۲۹	۱۷	بدون سابقه ابتلای به بیماری قبلی
۱۲/۵۳ (±۵/۸)	۹/۹۴ (±۶/۴)*	سن (سال)
۹/۹۴ (±۵/۸)	۸/۷ (±۵/۹)*	سن شروع بیماری (سال)
۴۵/۱ (±۱۲/۲)	۱۵/۵ (±۵/۶)*	مدت ابتلا (ماه)

* اعداد بر حسب (انحراف معیار ±) میانگین بیان شده‌اند.

نشد. میانگین سنی در گروه بیماران anti-GAD مثبت حدود ۱۰ سال ولی در گروه آنتی‌بادی منفی حدود ۱۲/۵ سال بود. یعنی گروه آنتی‌بادی مثبت دارای سن پایین‌تری بودند. میانگین سن شروع بیماری در گروه anti-GAD مثبت حدود ۹ سال و در گروه anti-GAD منفی حدود ۱۰ سال بود، همچنین از نظر مدت ابتلا به دیابت میانگین این مدت در گروه anti-GAD مثبت ۱۵ ماه و در گروه آنتی‌بادی منفی حدود ۴۵ ماه بود که در مورد سن ($p=0/05$) و مدت ابتلا ($p<0/05$) تفاوت آماری معنی‌دار بین دو گروه مشاهده شد، در حالی‌که در مورد سن شروع بیماری تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده نشد (جدول ۲).

مثبت بدون سابقه فامیلی و ۷ نفر (۳۸/۸٪) دارای سابقه فامیلی بودند. بین دو گروه از جهت سن و وجود آنتی‌بادی تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده نشد. بیماران از نظر سابقه ابتلای قبلی به بیماری‌های زمینه‌ای نظیر بیماری‌های عفونی و تیروئیدی به دو گروه تقسیم شدند که ۱۷ نفر (۹۴/۵٪) از بیماران anti-GAD مثبت در گروه بدون سابقه بیماری قبلی بودند. بین سابقه بیماری قبلی و مثبت بودن anti-GAD ارتباطی مشاهده نشد. از ۵۰ بیمار، ۴ نفر قبل از بیماری عفونی مبتلا بودند که یک نفر از آنان anti-GAD مثبت بود. بین بیماران anti-GAD مثبت و anti-GAD منفی از نظر سابقه بیماری قبلی و نیز سابقه ابتلای خانوادگی به دیابت تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده

جدول ۳- توزیع فراوانی بیماران براساس مدت ابتلا به بیماری

مدت ابتلا (ماه)	فراوانی	تعداد پسران	تعداد دختران	تعداد افراد آناتی بادی مثبت
< ۱	۱۲	۴	۸	۵
۱-۲۰	۱۹	۸	۱۱	۷
۲۰-۵۰	۹	۵	۴	۵
>۵۰	۱۰	۴	۶	۱
جمع	۵۰	۲۱	۲۹	۱۸

جدول ۴- توزیع فراوانی بیماران بر اساس سن

سن (سال)	فراوانی	تعداد پسران	تعداد دختران	تعداد افراد آناتی بادی مثبت (درصد)
۱-۵	۷	۴	۲	۵ (۲۸)
۵-۱۰	۱۱	۳	۸	۴ (۲۲)
۱۰-۱۵	۱۹	۷	۱۲	۸ (۴۵)
۱۵-۲۰	۸	۴	۴	۰ (۰)
۲۰-۲۵	۳	۱	۲	۰ (۰)
۲۵-۳۰	۲	۲	۰	۱ (۵)
جمع	۵۰	۲۱	۲۹	۱۸ (۱۰۰)

به افراد سالم بالاتر است ($p<0.01$). اندازه‌گیری میزان anti-GAD در واپستگان درجه یک بیماران به عنوان آزمایش غربالگر و پیش‌بینی‌کننده بسیار مفید است.^{۱۲} بر اساس نظریه زانون و همکارانش، عوامل ICA در ۳-۴٪ از واپستگان درجه یک بیماران وجود دارند که در صورت وجود این اتوآناتی بادی‌ها به همراه اختلال ترشح انسولین در آزمون وریدی تحمل گلوکز می‌توان پیش‌بینی نمود که در مدت ۵ سال بیشتر از ۵٪ خطر ابتلا به دیابت وجود دارد ولی اگر اختلالی در ترشح انسولین وجود نداشته باشد این خطر در مدت ۵ سال کمتر از ۲۵٪ خواهد بود.^{۱۳} طبق نتایج حاصل از این مطالعه، کمتر از ۲۵٪ از بیماران تیتر مثبت anti-GAD و ۶۴٪ تیتر منفی anti-GAD داشتند. طبق مطالعاتی که در سال‌های ۱۹۹۵، ۱۹۹۶، ۱۹۹۷ و ۲۰۰۱ در ژاپن، چین و استرالیا بر روی بیماران دیابتی نوع ۱ صورت گرفته بود، میزان شیوع این آناتی بادی $35.31/4$ ، $39/6$ و 37 درصد گزارش شده بود،^{۱۴-۱۹.۲۱.۲۲} همچنین در ایران مطالعه مشابهی در سال

بیشترین افراد بیمار anti-GAD مثبت، مدت ابتلای ۱-۲۰ ماه و کمترین آنان مدت ابتلای بیش از ۵۰ ماه داشتند. در ۱۹ نفر (۳۸٪) از ۵۰ بیمار مدت ابتلا ۱-۲۰ ماه بود. (جدول ۳). نفر (۴۴٪) از بیماران anti-GAD مثبت در گروه سنی ۱۰-۱۵ سال قرار داشتند و این گروه بیشترین فراوانی را دارا بود. کمترین فراوانی بیماران anti-GAD مثبت مربوط به گروه سنی ۱۵-۲۵ سال بود (جدول ۴). بین میزان anti-GAD و سن بیماران ($r=-0.155$)، سن شروع بیماری ($r=0.158$) و مدت ابتلا ($r=-0.036$) رابطه منفی وجود داشت.

بحث

در این مطالعه نشان داده شد که سطح سرمی اتوآناتی بادی ضد گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز در بیماران دیابتی نسبت به افراد سالم به شدت افزایش نشان می‌دهد ($p<0.0001$) و نیز سطح سرمی آن در واپستگان درجه یک بیماران نسبت

به دست آمده، فراوانی افراد بیمار با مدت ابتلای کمتر از یک ماه ۱۲ نفر، در گروه با مدت ابتلای ۱-۲۰ ماه ۱۹ نفر، در گروه با مدت ابتلای ۲۰-۵۰ ماه ۹ نفر و در گروه با مدت ابتلای بیش از ۵۰ ماه ۱۰ نفر بود. بیشترین فراوانی افراد بیمار مربوط به گروه با مدت ابتلای ۱-۲۰ ماه و کمترین آن در فاصله ۲۰-۵۰ ماه بود. تعداد افراد بیمار anti-GAD مثبت در گروه با مدت ابتلای یک ماه ۵ نفر، در گروه با مدت ابتلای ۱-۲۰ نفر، در گروه با مدت ابتلای ۲۰-۵۰ نفر و در گروه با مدت ابتلای بیش از ۵۰ ماه یک نفر بود، بیشترین فراوانی افراد آنتی‌بادی مثبت مربوط به گروه با مدت ابتلای ۱-۲۰ ماه بود و کمترین فراوانی افراد آنتی‌بادی مثبت مربوط به گروه با مدت ابتلای بیش از ۵۰ ماه بود. نتایج مطالعات در سال‌های ۱۹۹۲ در استرالیا،^{۱۳} ۱۹۹۶ در فنلاند،^{۱۷} در تایوان^{۲۰} و ۲۰۰۲ در تونس^{۲۵} نیز بیانگر آن است که میزان شیوع اتوآنتی‌بادی ضد گلوتامیک‌اسید دکربوکسیلاز در کسانی که به تازگی به دیابت مبتلا شده‌اند، بیشتر از کسانی بوده است که مدت ابتلای طولانی‌تری داشته‌اند. مدت ابتلای بیماران در ارتباط با وجود اتوآنتی‌بادی ضد گلوتامیک‌اسید دکربوکسیلاز از اهمیت خاص برخوردار است. بین میزان آنتی‌بادی و مدت ابتلا به بیماری رابطه منفی وجود دارد. هر قدر که مدت ابتلا کمتر است مقدار اتوآنتی‌بادی و تعداد بیماران anti-GAD مثبت بیشتر است. به هر حال نتایج به دست آمده در زمینه وجود anti-GAD در بیماران دیابتی فرضیات مطرح درباره نقش مهم آن را به عنوان آزمایش غربالگر در تعیین ریسک ابتلا به دیابت و نقش آن را در تعیین میزان تخریب سلول‌های بتا در بیماران تأیید می‌نماید. با به کارگیری این آزمون می‌توان راهکارهای درمانی مناسب را سریعتر اتخاذ کرد و تا حدودی از بروز عوارض متعدد این بیماری جلوگیری نمود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت کمک به انجام این مطالعه و نیز از تمامی کسانی که به نحوی ما را در به شمر رساندن این پژوهش یاری داده‌اند به ویژه از بیماران و خانواده‌های محترم آنان کمال تشکر را داریم.

۱۳۸۰ توسط خانم قرانلر و همکاران با هدف مقایسه این آنتی‌بادی در بیماران دیابتی نوع ۲ و وابستگان درجه اول آنان و نیز افراد سالم صورت گرفت که دو گروه بیماران دیابتی نوع ۲ و وابستگان آنان در این مطالعه از نظر میزان و فراوانی anti-GAD در مقایسه با افراد سالم تقاضت آماری معنی‌دار داشتند.^{۲۲}

هیچ یک از افراد سالم گروه شاهد این اتوآنتی‌بادی را در سرم خون خود نداشتند. نتایج مطالعه تومی‌لتو و همکاران در سال ۱۹۹۴ نیز نشان می‌دهد که هیچ‌کدام از افراد سالم گروه شاهد این اتوآنتی‌بادی را در سرم نشان ندادند.^{۲۳} در گروه وابستگان بیماران تنها یک نفر از ۲۵ فرد وابسته درجه یک ($\%2/9$) anti-GAD مثبت داشت. نتایج مطالعاتی که در سال ۱۹۹۳ در استرالیا^{۱۳} و در سال ۱۹۹۴ در آلمان^{۱۵} و در سال ۲۰۰۳ در مجارستان^{۲۴} بر روی وابستگان درجه یک بیماران صورت گرفت نیز موارد anti-GAD مثبت را در بین خویشاوندان بیماران نشان داده است. بیماری دیابت نوع ۱، بیماری با زمینه ژنتیک است^{۲۷} یکی از متغیرهای مورد بررسی، سابقه بیماری خانوادگی بود که از ۲۹ دختر، ۱۰ نفر ($\%34/5$) و از ۲۱ پسر ۸ نفر ($\%28/1$) دارای سابقه ابتلای خانوادگی بودند که تعداد افراد anti-GAD مثبت در گروه با سابقه فامیلی ۷ نفر و در گروه بدون سابقه فامیلی ۱۱ نفر بود. همچنین تعداد افراد anti-GAD منفی در گروه با سابقه فامیلی ۱۱ نفر و در گروه بدون سابقه فامیلی ۲۱ نفر بود. بنابراین می‌توان استنتاج نمود که اگرچه یکی از عوامل مؤثر در ابتلا به دیابت نوع ۱ سابقه خانوادگی است، بین مثبت بودن اتوآنتی‌بادی ضد گلوتامیک‌اسید دکربوکسیلاز و سابقه ابتلای خانوادگی ارتباطی وجود ندارد. عدم تقاضت معنی‌دار بین دو گروه بیمار anti-GAD مثبت و anti-GAD منفی از جهت سابقه بیماری قبلی می‌تواند نشانه آن باشد که اگرچه سابقه ابتلا به بیماری قبلی و زمینه‌ای مانند بیماری‌های عفونی می‌تواند منجر به بروز دیابت گردد،^{۲۷} با وجود یا مقدار اتوآنتی‌بادی ضد گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز ارتباط ندارد. تقاضت معنی‌دار آماری بین سن بیماران anti-GAD مثبت و anti-GAD منفی شاید بیانگر آن باشد که افرادی که در سن پایین‌تری دچار دیابت می‌شوند تیز سرمی بالاتری از anti-GAD دارند و تخریب سلول‌های بتا در آنها سریع‌تر صورت می‌گیرد. در ارتباط با مدت ابتلا به بیماری طبق نتایج

References

1. Lantion-Ang LC. Epidemiology of diabetes mellitus in Western pacific region: focus on Philippines. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 50 Suppl 2: S29-34.
2. Larijani B, Zahedi.F, Aghakhani Sh. Epidemiology of Diabetes Mellitus in Iran. *Shiraz E-medical Journal*, 2002; 3(3).
3. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2005; 115: 485-91.
4. Achenbach P, Koczwara K, Knopff A, Naserke H, Ziegler AG, Bonifacio E. Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes. *J Clin Invest* 2004; 114: 589-97.
5. Raz I, Eldor R, Naparstek Y. Immune modulation for prevention of type 1 diabetes mellitus. *Trends Biotechnol* 2005; 23: 128-34.
6. Sukhareva BS, Mamaeva OK. Glutamate decarboxylase: computer studies of enzyme evolution. *Biochemistry (Mosc)* 2002; 67: 1180-8.
7. Ueno H. Enzymatic and Structural aspects on Glutamat Decarboxylase. *J Mol Catal B Enzym* 2000; 10: 67-79.
8. Rubi B, Ishibara H, Hegardt FG, Wollheim CB, Maechler P. Decarboxylation Reduce Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cells. *J Biol Chem* 2001; 276:36391-6.
9. Tree TI, Morgensthaler NG, Duhindan N, Hicks KE, Madec AM, Scherbaum WA, et al. Two amino acids in glutamic acid decarboxylase act in concert for maintenance of conformational determinants recognised by Type I diabetic autoantibodies. *Diabetologia* 2000; 43: 881-9.
10. Ishii M, Hasegawa G, Fukui M, Obayashi H, Ohta M, Ogata M, et al. Clinical and genetic characteristics of diabetic patients with high-titer (>10,000 U/ml) of antibodies to glutamic acid decarboxylase. *Immunol Lett* 2005; 99: 180-5.
11. Lernmark A. Selecting culprits in type 1 diabetes beta-cell killing. *J Clin Invest* 1999; 104: 1487-9.
12. Lopez-Luchi JV. Autoimmune diabetes: is GAD the culprit? *Eur J Endocrinol* 1999; 141: 458-9.
13. Chen QY, Rowley MJ, Byrne GC, Jones TW, Tuomi T, Knowles WJ, et al. Antibodies to glutamic acid decarboxylase in Australian children with insulin-independent diabetes mellitus and their first-degree relatives. *Pediatr Res* 1993; 34: 785-90.
14. Tuomilehto J, Zimmet P, Mackay IR, Koskela P, Vidgren G, Toivanen L, et al. Antibodies to glutamic acid decarboxylase as predictors of insulin-dependent diabetes mellitus before clinical onset of disease. *Lancet* 1994; 343: 1383-5.
15. Roll U, Christie MR, Stadl E, Ziegler AG. Associations of anti-GAD antibodies with islet cell antibodies and insulin autoantibodies in first-degree relatives of type I diabetic patients. *Diabetes* 1994; 43: 154-60.
16. Akira T, Ikuro M., Aracel P. Antibodies to GAD 65 and a tyrosin phosphataselike molcule IA - 2ic in filipino type diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 1995; 25:191-9.
17. Sabbah E, Kulmala P, Veijola R, Vahasalo P, Karjalainen J, Tuomilehto-Wolf E, et al. Glutamic acid decarboxylase antibodies in relation to other autoantibodies and genetic risk markers in children with newly diagnosed insulin-dependent diabetes. *Childhood Diabetes in Finland Study Group. J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2455-9.
18. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bcd/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 1996; 45: 926-33.
19. Chan JC, Yeung VT, Chow CC, Ko GT, Mackay IR, Rowley MJ, et al. Pancreatic beta cell function and antibodies to glutamic acid decarboxylase (anti-GAD) in Chinese patients with clinical diagnosis of insulin-independent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 32: 27-34.
20. Chuang LM, Lin CY, Wu HP, Tsai WY, Tai TY, Lin BJ. Anti-GAD65 autoantibody in Taiwanese patients with insulin-dependent diabetes mellitus: effect of HLA on anti-GAD65 positivity and clinical characteristics. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997; 47: 455-61.
21. Thai AC, Ng WY, Loke KY, Lee WR, Lui KF, Cheah JS. Anti-GAD antibodies in Chinese patients with youth and adult-onset IDDM and NIDDM. *Diabetologia* 1997; 40: 1425-30.
22. Medici F, Mohammed I. Detection of glutamic acid decarboxylase autoantibodies in Filipino diabetic patients Type 1 and Type II. *Diabetes Care*, 1999;22(9):364-70.
23. Mendoza-Morfin F, Curiel-Perez MO, Cardenas-Tirado H, Montero-Gonzalez P, Gutierrez-Avila C, Bravo-Rios LE, et al. Frequency of glutamic acid decarboxylase autoantibodies in Mexican diabetic children. *Rev Invest Clin* 2000; 52: 427-31.
24. Soriguer E, Escotet IE. Prevalence of glutamic acid decarboxylase auto antibodies and diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2001;56(3):213-20.
25. Elkadhi A, Khelifi N, Abid A, Nagati K, Jenhani F, Ben Rayana MC. Prevalence of anti-GAD autoantibodies in Tunisian children with type 1 diabetes. *Tunis Med* 2002; 80: 281-5.
26. Hermann R, Gombos Z, Gyurus E, Soltesz G. Prevalence and predictive value of GAD65 autoantibodies and their correlation with HLA DR-DQ genotypes in children with type-1 diabetes. *Orv Hetil* 2003; 144: 355-60.
27. Kulmala P, Savola K, Petersen JS, Vahasalo P, Karjalainen J, Lopponen T, et al. Prediction of insulin-independent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. *The Childhood Diabetes in Finland Study Group. J Clin Invest* 1998; 101: 327-36.
28. Schlosser M, Banga JP, Madec AM, Binder KA, Strebelow M, Rjasanowski I, et al. Dynamic changes of GAD65 autoantibody epitope specificities in individuals at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetologia* 2005; 48: 922-30.
29. Damanhouri LH, Dromey JA, Christie MR, Nasrat HA, Ardawi MS, Robins RA, et al. Autoantibodies to GAD and IA-2 in Saudi Arabian diabetic patients. *Diabet Med* 2005; 22: 448-52.
30. Yang L, Zhou ZG, Huang G, Ouyang LL, Li X, Yan X. Six-year follow-up of pancreatic beta cell function in adults with latent autoimmune diabetes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2900-5.
31. Prazny M, Skrha J, Limanova Z, Vanickova Z, Hilgertova J, Prazna J, et al. Screening for associated

- autoimmunity in type 1 diabetes mellitus with respect to diabetes control. *Physiol Res* 2005; 54: 41-8.
۲۲. - قراظر ج. مقایسه میزان anti-GAD در سرم بیماران دیابتی نوع ۲ و باستگان درجه اول آنها و مقایسه آن با افراد سالم، پایان نامه دانشگاه علوم پزشکی ایران، ۱۳۸۰.
۲۳. مصری پور منوچهر و همکاران، کاربرد تعیین آنتی بادی علیه آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز در تشخیص زودرس دیابت وابسته به انسولین، مجموعه مقالات سیزدهمین کنگره فیزیولوژی - فارماکولوژی ایران، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۱۳۷۶.
۲۴. یزدچی ل و همکاران، القای آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز E.coli به منظور ارزیابی کارآیی آن در ایجاد تولرانس خوراکی در مدل آزمایشگاهی IDDM، مجموعه مقالات چهاردهمین کنگره فیزیولوژی - فارماکولوژی ایران، تهران، ۱۳۷۸.
35. Hamaguchi K, Kimura A, Kusuda Y, Yamashita T, Yasunami M, Takahasi M, et al. Clinical and genetic characteristics of GAD antibody positive patients initially diagnosed as having type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 66: 163-71.
36. Suzuki R, Shimada A, Maruyama T, Funae O, Morimoto J, Kodama K, et al. T-cell function in anti-GAD65(+)diabetes with residual beta-cell function. *J Autoimmun* 2003; 20: 83-90.
37. Kulmala P. Prediabetes in children: natural history, diagnosis, and preventive strategies. *Paediatr Drugs* 2003; 5: 211-21.

Original Article

A survey on the presence of anti-GAD in type 1 diabetic patients and their first-degree relatives in comparison with healthy individuals

Nadri M, Jalali M, Sabour A, Jedd Tehrani M, Sadeghi M, Dorosti A.

Department of Nutrition and Biochemistry, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

Abstract:

Introduction: Glutamic acid decarboxylase (GAD) catalyzes the conversion of glutamic acid to γ -aminobutyric acid (GABA). GAD65 isozyme is present in the pancreatic β -cells. In the prediabetes period and during the β -cell destruction, GAD is released as an autoantigen and anti-GAD autoantibodies appear in serum. Islet Cell Autoantibodies (ICAs) including anti-GAD are detectable in serum of diabetic patients up to 10 years before appearance of diabetes symptoms. This is an important predictive marker for diagnosis of prediabetic patients, especially in the first-degree relatives of diabetic patients for genetic factors. Anti-GAD is an important marker for detection of β -cells destruction. The patients with high titers of anti-GAD have a worse disease prognosis and are in greater need of insulin injections. **Materials and Methods:** This survey is a case-control study aimed at detection of anti-GAD presence in sera of type 1 diabetic patients and their first-degree relatives and comparison with healthy individuals. Fifty type 1 diabetic patients with mean age of 12.24 ± 6.2 years and mean disease duration of 34.5 ± 8.4 months, 35 first-degree relatives and 50 normal individuals without familial diabetes were included in the study; all the individuals were chosen by a random sampling method. The values of fasting blood sugar were determined in first-degree relatives and controls and all were found to be normal. The values of anti-GAD were determined by ELISA method. **Results:** Median values of anti-GAD in cases and controls were 28, (range: 5-2700) ng/ml and 2, (0-10) ng/ml, respectively. The anti-GAD titers were significantly higher in patients than in normal individuals and relatives together ($p<0.0001$). Median value of anti-GAD in first-degree relatives was 7, (0-950) ng/ml. There was a significant statistical difference between anti-GAD titers in first-degree relatives and controls, ($p<0.01$). There was a significant difference between mean value of age and diabetes duration in anti-GAD positive and anti-GAD negative patients, ($p<0.05$). There was a negative correlation between anti-GAD and age, diabetes duration, disease beginning age of patients, ($r= -0.155, -0.158, -0.036$), respectively. **Conclusion:** By increasing of anti-GAD in diabetic patients and their first-degree relatives it may be concluded that measurement of anti-GAD is an important and beneficial tool for detection and diagnosis of prediabetic and diabetic patients.

Key Words: Glutamic acid decarboxylase, Anti-GAD, Diabetes, ICA S.