

نقش اتوآنتی بادی GAD65 در دیابت ملیتوس و وابستگان درجه اول آنها و مقایسه آنها با افراد سالم

دکتر مهین دخت کیهانی، دانشیار بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی ایران
دکتر منوچهر نخبجانی، دانشیار فوق تخصص غدد دانشگاه علوم پزشکی تهران

The Role of GAD65 Autoantibody in Diabetes Mellitus and Their First-Degree Relatives and Comparison With Healthy Persons ABSTRACT

The diabetes is an autoimmune disease, in which the role of autoantibodies is of a specific importance. The appearance of these autoantibodies can be the first symptom in the serum of type I diabetic patients, which may appear ten years before onset of the disease. The most important autoantibodies include Glutamic acid decarboxylase autoantibodies (GAD65-Ab). This can be used as a good tool for prediction in screening tests in type I diabetic patients.

In the present study with procedure RIA, we investigated the level of GAD65-Ab in patients with diabetes type I and their close relatives, and compared them with healthy persons.

From the type I diabetic patients who have been suffering from the disease for periods of one week to twenty years, 63.3% of them had positive Anti-GAD65. This ratio was 8% in their close relatives, and 0% in healthy persons. The difference in Anti-GAD65 between the healthy persons and close relatives of patients was significant.

This test may be employed in diabetes type I, as a screening test, and confirms the results of studies which have been conducted so far outside this country.

Key Words: Diabetes type I; Glutamic acid decarboxylase autoantibodies (GAD65-Ab); Close relatives; Screening test

چکیده

دیابت یک بیماری اتوایمیون می باشد که نقش اتوآنتی بادیها در این بیماری از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در مرحله پره دیابتیک یعنی حداکثر ۱۰ سال قبل از استقرار بیماری، اتوآنتی بادیها در سرم خون بیماری دیابتی نوع I و در وابستگان درجه اول آنها و افرادی که دیابت در آنها به تازگی تشخیص داده شده ظاهر می گردند. با اندازه گیری این اتوآنتی بادیها قبل از شروع علائم بالینی و آزمایشگاهی و یا میزان بالا رفتن قند خون و ظهور قند در ادرار می توان بیماری دیابت را تشخیص داد. مهمترین این اتوآنتی بادیها گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD) می باشد که در اثر تخریب

سلولهای بتا جزایر لانگرهانس بمرور زمان از سلولها آزاد شده و در سرم خون بیماران ظاهر می گردد. بنابراین اندازه گیری اتوآنتی بادی گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD65-Ab) بعنوان یک تست پیشگویی کننده و غربالگری برای تعیین خطر آشکار شدن دیابت ملیتوس نوع I وابسته به انسولین (IDDM) در افراد می تواند مورد بررسی قرار گیرد. اندازه گیری GAD65-Ab در بیماران دیابتی نوع I و وابستگان درجه اول آنها و مقایسه ایند و با افراد سالم که هدف بررسی این مطالعه است توسط روش (RIA) انجام شد. از ۳۰ بیمار دیابتی نوع I (کنترل مثبت) ۶۳/۳ درصد واجد

اتو آنتی بادی (GAD65-Ab) قابل اندازه گیری است و فرصتی برای پیش بینی و پیشگیری از آغاز علائم بالینی بیماری را فراهم می کند (۱).

در پی پیدایش این اتو آنتی بادی تحمل فرد به گلوکز مختل شده و در نهایت بطور ناگهانی دیابت نوع I آغاز می گردد. بلافاصله کمی پس از آغاز بیماری، این اتو آنتی بادی در سرم خون ۹۰ درصد از بیماران ظاهر می شود ولی پس از گذشت ۲۰ سال از شروع بیماری این میزان به ۵۰-۱۰ درصد می رسد. GAD65 یک ملکول پروتئینی ۶۴ کیلو دالتونی است که در سلولهای بتای جزایر لانگرهانس وجود دارد. این پروتئین آنزیمی است از گروه دکربوکسیلازها که قادر به برداشتن عامل کربوکسیل از روی گلوتامیک اسید است و آنرا به GABA تبدیل می کند. در اثر تخریب سلولهای بتا، بمرور زمان این پروتئین آزاد شده و اتوآنتی بادی ضد آن در سرم بیمار بوجود می آید.

GAD65-Ab در سرم خون حدود ۹۰-۸۵ درصد افرادی که بتازگی در آنها دیابت تشخیص داده شده و نیز در بیش از ۸۰ درصد افراد پره دیابتی از بستگان درجه اول بیماران دیده شده است (۲ و ۳). جالب توجه این است که در هیچ یک از سایر بیماریهای اتو ایمنون و یا افراد سالم، این اتوآنتی بادی بطور ثابت وجود ندارد و یا گاهی اوقات در بعضی از گزارشات حداکثر تا ۲ درصد وجود این اتوآنتی بادی اعلام شده است (۴).

این تست بنابراین می تواند به عنوان یک تست پیش بینی کننده در غربالگری برای تعیین خطر آشکار شدن IDDM (دیابت ملتیوس وابسته به انسولین) در افراد مورد استفاده قرار گیرد. حساسیت این تست در حدود ۸۲/۱ درصد، ویژگی آن در بیشتر گزارشات ۱۰۰ درصد اعلام شده است (۵).

نظر به اهمیتی که Anti-GAD مثبت در پیش بینی دیابت نوع I دارد و کاربرد آن در آینده انواع دیگر بیماری دیابت وابسته به انسولین و اهمیتی که Anti-GAD مثبت دارد، امید است در کشور ما نیز اقداماتی جهت روتین شدن این تست یا خالص سازی آنتی ژن تست (GAD) از مغز موش، خوک، میمون و انسان اقداماتی صورت می گیرد تا هر بیشتر از صرف هزینه های گزاف درمان و نگهداری بیماران دیابتی کاسته گردد.

تیتراژ مثبت Anti-GAD بودند که مدت ابتلای آنها به بیماری از یک هفته تا ۲۰ سال بود. از ۵۰ نفر وابستگان درجه اول بیماران (گروه پژوهش یا case) ۸ درصد و از ۸۰ نفر افراد سالم (کنترل منفی) صفر درصد واجد تیتراژ مثبت Anti-GAD بودند. بین افراد سالم با وابستگان درجه اول بیماران مبتلا به دیابت نوع I اختلاف معنی داری وجود داشت.

این تست می تواند به عنوان ابزار پیش بینی کننده، در غربالگری وابستگان درجه اول بیماران و افراد مبتلا به دیابت، ۱۰ سال قبل از بروز علائم بالینی کاربرد داشته باشد.

مقدمه

دیابت یک اختلال پیچیده متابولیکی درون ریز است که تعداد زیادی از افراد در سراسر جهان بدان مبتلا هستند. هر ساله چندین هزار نفر به این افراد اضافه می شوند که اکثر آن از کودکان و نوجوانان می باشند و هنوز علاج قطعی برای آن مشخص نشده است.

انسولین مترشحی از سلولهای بتای پانکراس برای متابولیسم طبیعی بدن ضروریست. در صورت قطع ترشح آن، متابولیسم طبیعی بدن مختل می گردد و هیپرگلیسمی بوجود می آید.

سالیانه بودجه زیادی در سراسر جهان همراه با مراقبتهای بهداشتی بابت این بیماری هزینه می شود، بنابراین تشخیص اولیه و زودرس با یک هدف یعنی یافتن معالجه موثر برای این بیماری تهدید کننده زندگی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. البته برای پیدا شدن معالجه موثر نیاز به مارکرها و علامت دهندگانی کاملاً درست و اختصاصی دارد.

تحقیقات انجام شده توسط محققین نشان داد که اندازه گیری یکی از این علامت دهندگان به نام اتوآنتی بادی دکربوکسیلاز (GAD65-Ab) می تواند جهت بررسی سلولهای بتای پانکراس ارزش بالینی زیادی برای متخصصین بالینی داشته باشد، چراکه آغاز علائم بالینی دیابت نوع I زمانی است که ۹۰-۸۰ درصد سلولهای بتا از بین رفته باشند، در این مرحله طولانی یعنی ۱۰ سال قبل از استقرار دیابت این

روش و مواد

یافته‌ها

در این پژوهش یک گروه از بیماران با تشخیص دیابت نوع I توسط معاینه بالینی و با انجام آزمایشات لازم زیر نظر پزشک متخصص بعنوان کنترل مثبت برای Anti-GAD و یک گروه از افراد سالم که هیچگونه سابقه بیماری خاصی در آنها و یا در والدین و یا در جد آنها وجود نداشت بعنوان کنترل منفی برای Anti-GAD و یک گروه از وابستگان درجه اول بیماران مبتلا به دیابت نوع I بعنوان نمونه پژوهشی (Case) انتخاب شدند. تعداد ۳۰ بیمار دیابتی نوع I بعنوان کنترل مثبت برای Anti-GAD و ۵۰ نفر از وابستگان درجه اول بیماران بعنوان گروه پژوهش (Case) و ۸۰ نفر از افراد سالم بعنوان کنترل منفی برای Anti-GAD انتخاب گردیدند.

از تمام گروهها صبح ناشتا خونگیری بعمل آمد و پس از جدا نمودن سرم از خون آنها در لوله‌های همولیز ریخته و در محیط ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان آزمایش نگهداری شد. برای اطمینان از نبودن افراد مبتلا به دیابت در گروه کنترل منفی و گروه پژوهش، آزمایش قند خون برای تمام گروهها انجام شد.

روش‌های اندازه‌گیری Anti-GAD و سوبستراهای مصرفی متفاوتند. از جمله این روش‌ها می‌توان: الایزا (ELISA)، رادیو ایمنونواسای (RIA)، رادیویابیندیگ اسای (RBA= Radiobinding assay) و سایر روشها را نام برد.

روش RIA (Radio Immuno Assay) ۱۵-۱۰ برابر حساس‌تر از سایر روشهاست. در بین روشهای فوق در حال حاضر روش ELISA و RIA در دنیا بحالت روتین بکار برده می‌شود.

ما در این بررسی از روش RIA استفاده نمودیم. برای انجام آزمایش GAD65-Ab بر اساس روش RIA از کیت شرکت Kronus واقع در ایالات کالیفرنیا استفاده کردیم. حساسیت این تست توسط کمپانی مربوطه، ۹۰ درصد اعلام شده است (۶ و ۷).

در این بررسی، مقایسه‌ای بین میزان اتوآنتی‌بادی بر علیه گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز در بیماران دیابتی نوع I و وابستگان درجه اول آنها با افراد سالم بعمل آمد. در ضمن درصد افراد دیابتی و وابستگان درجه اول آنها که تیتراژ مثبت Anti-GAD65 داشتند مشخص گردید و در مقایسه این دو گروه با افراد سالم اختلاف معنی‌داری بدست آمد.

در جدول ۱، مشخصات بیماران دیابتی نوع I (کنترل مثبت) از لحاظ سن و جنس و با تیتراژ مثبت Anti-GAD65 به تفکیک نشان داده شده است. از ۳۰ نفر بیمار دیابتی نوع I (کنترل مثبت) بین سن ۴۰-۱۰ سال، ۱۷ نفر زن و ۱۳ نفر مرد بودند. در نمودار (۱) تعداد Anti-GAD65 مثبت و منفی در ۳ گروه مورد مطالعه نشان داده شده است. از ۳۰ بیمار دیابتی نوع I (گروه کنترل مثبت) ۱۹ نفر با تیتراژ مثبت Anti-GAD65 (۶۳/۳ درصد) و ۱۱ نفر با تیتراژ منفی Anti-GAD65 (۳۶/۶ درصد) بودند. از ۱۹ نفر با تیتراژ مثبت Anti-GAD65، ۱۱ زن (۳۶/۷ درصد) و ۸ مرد (۲۶/۶ درصد) از ۱۱ نفر با تیتراژ منفی Anti-GAD65، ۳ زن (۶۳/۳ درصد) بدست آمد.

از ۵ نفر وابستگان درجه اول بیماران دیابتی (گروه پژوهش) سه نفر زن و یک نفر مرد واجد تیتراژ مثبت Anti-GAD65 بودند، به عبارتی ۴ نفر (۸ درصد) مثبت بدست آمد.

از ۸۰ نفر افراد سالم (گروه کنترل منفی) ۴۰ زن و ۴۰ مرد همگی واجد Anti-GAD65 منفی بودند.

از ۳۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع I که مدت ابتلا آنها از یک هفته تا ۲۰ سال در نظر گرفته شده بود، میانگین مدت ابتلا ۴/۲۲ سال بدست آمد.

در نمودار (۲)، مشخصات سه گروه مورد مطالعه به تفکیک از لحاظ جنس و تعداد نشان داده شده است. از ۸۰ فرد سالم (کنترل منفی) ۴۰ نفر زن و ۴۰ نفر مرد بودند که بین ۳۰-۱۰ سال سن داشتند.

از ۵۰ نفر وابستگان درجه اول بیماران دیابتی نوع I (گروه پژوهش) ۲۵ نفر زن و ۲۵ نفر مرد بودند.

از ۳۰ نفر بیمار مبتلا به دیابت نوع I (کنترل مثبت) ۱۷ نفر زن و ۱۳ نفر زن بودند که بین سن ۴۰-۱۰ سال قرار داشتند.

از مثبت شدن، بطور پایدار مثبت باقی می ماند. طولانی ترین زمان مثبت شدن GAD65-Ab قبل از شروع علائم بالینی و آزمایشگاهی، ۱۰ سال علائم شده و در عین حال یک تست مثبت هیچگاه بعدها منفی نمی شود (۸).

در این مطالعه بر اساس جداول ارائه شده ۶۳/۳ درصد (۱۹ نفر) از بیماران دیابتی نوع I، واجد Anti-GAD65 مثبت بودند و شیوع سن ابتلا به بیماری بیشتر بین ۱۰-۲۰ سال بدست آمد. از نظر جنس زنان بیش از مردان واجد Anti-GAD65 مثبت بودند. پس می توان نتیجه گرفت که وجود آنتی GAD تابع سن و جنس است و این نشاندهنده این می باشد که خود ایمنی در مقابل GAD در افراد بالای ۱۰ سال شایعتر از کودکان است و شیوع ابتلا به بیماری در سن بلوغ است (۹). این نتایج بدست آمده از تحقیقات با سایر مطالعات همخوانی دارد (۱۰). بدین ترتیب، انجام تست اتوآنتی بادی GAD در بیماران می تواند در تشخیص و اتخاذ روش درمان مناسب کمک کننده باشد.

بر اساس نمودار یک ارائه شده در مطالعه، از ۸۰ نفر افراد کنترل سالم (شامل ۴۰ نفر زن و ۴۰ نفر مرد)، ۶۲ نفر واجد تیترا Anti-GAD65 مساوی صفر و ۱۸ نفر بقیه واجد تیترا بین 0.348 - 0.751 U/L بودند که بر مبنای تیترا مثبت رفرنس ($\text{Anti GAD}+65 = >1 \text{ U/L}$) تماماً منفی تلقی شدند. بر اساس سایر تحقیقات انجام شده بایستس ۵-۲ درصد افراد نرمال واجد Anti-GAD65 مثبت باشند (۵). این تیترا مثبت در افراد سالم ناپایدار و در واقع یک اتوایمیونیتی گذرا نسبت به GAD است.

در همین نمودار نشان داده شده که ۸ درصد (۴ نفر) از ۵۰ نفر وابستگان درجه اول بیماران واجد Anti-GAD65 مثبت بودند که بر اساس سایر تحقیقات انجام شده بایستی ۱۰-۰ درصد وابستگان بر مبنای استعداد ژنتیکی واجد Anti-GAD65 مثبت باشند. پس از این تست می توان در وابستگان درجه اول بیماران دیابتی نوع I بعنوان یک تست پیش بینی کننده استفاده نمود. همچنین در مورد استعداد ژنتیکی با توجه به سابقه خانوادگی در این مطالعه، ۷ بیمار از ۱۹ بیمار واجد تیترا مثبت Anti-GAD65 دارای والدین دیابتی بودند که این نیز از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

در بیماران دیابتی نوع I اگر پدر یا مادر مبتلا به دیابت باشد

جدول ۱- مشخصات بیماران دیابتی نوع I (کنترل مثبت با تیترا مثبت Anti-GAD65 به تفکیک سن و جنس)

Anti-GAD ⁺ ₆₅	مرد	زن	فراوانی	سن به سال
۸	۵	۶	۱۱	۱۰-۱۵
۵	۴	۴	۸	۱۵-۲۰
-	۱	۱	۲	۲۰-۲۵
۳	-	۴	۴	۲۵-۳۰
۳	۳	۲	۵	۳۰-۴۰
۱۹	۱۳	۱۷	۳۰	جمع کل

بحث

بیماری دیابت نوع I یک بیماری اتوایمیون می باشد که نقش اتوآنتی بادیها در آن از اهمیت ویژه ای برخوردارند. ظهور این اتو آنتی بادیها، اولین علامت در بیماران به شمار می آید. مهمترین این اتوآنتی بادیها GAD65 می باشد که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است.

در حالیکه تحقیقات در مورد Anti-GAD65 از سال ۱۹۸۰ در خارج از کشور شروع شده و هنوز هم بطور جدی ادامه دارد، اندازه گیری این اتوآنتی بادی در ایران برای اولین بار انجام شده است.

بر اساس تحقیقات انجام شده حساسیت تست بین ۸۵-۹۰ درصد و ویژگی آن ۱۰۰ درصد می باشد. این آزمایش روی بیماران دیابتی نوع I قبل از درمان با انسولین بیشتر کار شده و می توان جهت بررسی شدت تخریب سلولهای بتا و نیاز درمان بیماران با انسولین بکار برده شود. ضمناً در بیماران تازه مبتلا شده جهت تعیین حساسیت و ویژگی این تست کاربرد دارد.

همچنین درصد افراد پره دیابتی از اقوام درجه اول بیماران دیابتی بعنوان یک تست پیش بینی کننده و غربالگری بکار برده می شود (۸). چنانچه بیماران واجد Anti-GAD65 مثبت باشند بایستی با انسولین درمان شوند. ضمناً در بیماران دیابتی نوع II (NIDDM) غیر وابسته به انسولین که حدود ۳۹ درصد به انسولین وابستگی پیدا می کنند نیز این تست مثبت می شود (۵).

بر اساس تحقیقات انجام شده، تست Anti-GAD65 پس

(۳/۶۳ درصد)، چونکه بلافاصله کمی پس از پیدایش دیابت بایستی در خون ۹۰ درصد بیماران، آنتی‌بادی‌های ضد سلولهای بتای جزایر لانگرهانس تظاهر نمایند. ولی در ۵۰-۵۱ درصد موارد پس از گذشت ۲۰ سال از بیماری آنتی‌بادیهای ضد سلولهای بتای پانکراس از خون پاک می‌شوند (۷). پس GAD-Ab در پیش‌بینی IDDM بمدت طولانی بالا خواهد بود (۱۱). با توجه به نتایج بدست آمده، امید است از تست GAD-Ab در بیماران دیابتی نوع I و وابستگان درجه اول آنها و مقایسه ایندو گروه با افراد سالم بعنوان یک تست رایج جهت پیش‌بینی بیماری و نیز کاربردهای دیگر آن استفاده گردد، تا شاید کمکی هرچند ناچیز به تحقیقات در مورد بیماران مبتلا به دیابت به عمل آید.

به احتمال ۵۰-۵۱ درصد فرزندش به دیابت مبتلا می‌شود، ولی اگر هر دو مبتلا باشند به احتمال ۲۰ درصد فرزندانشان به دیابت مبتلا می‌گردند. احتمال ابتلا خواهر یا برادر یک فرد دیابتی به این بیماری ۱۰-۳۰ درصد می‌باشد.

بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق، محاسبه میانگین مدت ابتلاء بیماران دیابتی نوع I از اهمیت خاصی برخوردار است، چونکه لازم است بیماران در زمان شروع بیماری و قبل از شروع درمان با انسولین مورد آزمایش قرار گیرند تا بدینوسیله حساسیت تست در این بیماران با روش RIA، ۹۰ درصد اعلام شود. در این بررسی میانگین مدت ابتلاء، ۴/۲ سال (از یک هفته تا ۲۰ سال) بود که از شروع بیماری گذشته بود، بنابراین درصد حساسیت تست کم شد

منابع

- 1- Vanderwalle, Christinal, et al. High Diagnostic sensitivity of Glutamic Acid Decarboxylase autoantibodies in insulin Dependent diabetes mellitus with clinical onset between Age 20 and 40 year. *Journal of clinical endocrinology and Metabolism* 1995;80(3):846-51.
- 2- Baekkeskov S, et al, Identification of the 64K Autoantigen in Insulin Dependent Diabetes as the GABA synthesizing Enzyme Glutamic Acid Decarboxylase. *Nature* 1990;347: 151-56.
- 3- Verge, Charles F, et al. Prediction of type I Diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GDA and IC A 512bdc/ IA-2 Autoantibodies. *Diabetes* 1996;45: 926-933.
- 4- Panina Bordignon P, et al. Cytotoxic T-cells Specific for Glutamic acid decarboxylase in Autoimmune diabetes. *J Exp Med* 1995;181(5):1923-7.
- 5- Tuomilehto J, et al. Antibodies to Glutamic acid Decarboxylase as predictors of Insulin dependent diabetes mellitus before clinical onset of disease. *Lancet* 1994;343 (8910):1383-5.
- 6- Gottsater A, et al. Glutamat decarboxylase antibody levels predictive of B-cell decline in adult onset diabetes. *diabetes research and clinical practice* 1995;27:133-140.
- 7- Schmidli Roberts, et al. Disease Sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies, the second international GAD-Ab workshop. *Diabetes* 1995;44: 636-40.
- 8- Orrell RW. Antibodies to Glutamic Acid Decarboxylase as predictive of insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1994;344(8917):267.
- 9- Emad sabbah, et al. Glutamic acid decarboxylase antibodies in relation to other autoantibodies and genetic risk markers in children with Newly diagnosed Insulin dependent. *J clin Endocrinol Metab* 1997;81(7):2455-2459.
- 10- Zimmel PZ, et al. Latent Autoimmune Diabetes Mellitus in adults (LADA), The role of antibodies to Glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabetes* 1994;11(3):299-303.
- 11- Roll U, et al. Associations of Anti GAD Antibodies with Islet cell antibodies and insulin autoantibodies in first degree relative of type I diabetic patients. *Diabetes* 1994; 43:154-60.