

ارتباط بین فاکتور رشد شبه انسولین - ۱ و هموگلوبین گلیکوزیله در بیماران دیابتی نوع ۱

نصرت الله ضرغامی*: استادیار دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی علوم دارویی، تبریز
 رادینا اشتیاقی: استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، بخش فوق تخصصی غدد بیمارستان امام خمینی، ارومیه
 علی خسرویگی: دانشجوی دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز
 دیان دایر: کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
 جمال حلاج زاده: کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربردی علوم دارویی، تبریز

چکیده

مقدمه: دیابت شایعترین بیماری غدد درون ریز در انسان است. عدم کنترل دیابت به موازات پیشرفت آن به عوارضی از قبیل رتینوپاتی و نوروپاتی منجر می‌شود. در حال حاضر برای کنترل طولانی مدت دیابت از اندازه گیری هموگلوبین گلیکوزیله (HbA_{1c}) استفاده می‌گردد اما به علت عدم دسترسی به یک روش استاندارد همگانی برای آن، یافته‌های جدید فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (IGF-I) را به عنوان شاخص احتمالی کنترل دیابت مطرح نموده‌اند. در این مطالعه ارتباط بین میزان غلظت‌های سرمی تام IGF-I و HbA_{1c} بررسی می‌گردد.

روشها: این مطالعه مورد-شاهدی مقطعی بر روی ۲۶ بیمار دیابتی نوع ۱ (۱۵ مرد و ۱۱ زن با میانگین سنی ۲۳/۷±۹/۱ سال) تازه تشخیص داده شده که فاقد عوارض پیشرفته این بیماری بودند انجام شد. گروه شاهد شامل ۲۶ فرد سالم (۹ مرد و ۱۷ زن با میانگین سنی ۲۴/۱±۴/۴ سال) بود. میزان گلوکز ناشتایی پلازما (FPG)^۱ با استفاده از روش آنزیمی (گلوکز اکسیداز) و HbA_{1c} به روش کالریمتری اندازه‌گیری شدند. IGF-I و پروتئین شماره ۳ متصل‌شونده به آن (IGFBP-3)^۲ به طریق ایمنونواسی اندازه‌گیری شدند. معنی‌دار بودن آماری برای سطح $P < 0/05$ دو دنباله در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: میانگین غلظت IGF-I در گروه بیماران به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد بود ($P < 0/05$). بین میانگین سطوح IGF-I و HbA_{1c} همبستگی معکوس معنی‌داری ملاحظه گردید ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های این مطالعه نتیجه گرفته شد هنگامی که دیابت به‌خوبی کنترل نباشد، غلظت سرمی IGF-I کاهش می‌یابد. از طرف دیگر غلظت سرمی تام IGF-I با HbA_{1c} همبستگی داشت لذا شاید بتوان از میزان IGF-I به‌طور غیرمستقیم به‌عنوان نشانگر میزان کنترل قند خون در دیابت استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: دیابت نوع ۱، IGF-I، HbA_{1c}، گلوکز ناشتایی پلازما

¹ Insulin-like growth factor-I

² Fasting plasma glucose

³ IGF binding protein-3

مقدمه

دیابت شایعترین بیماری غدد درون ریز در انسان است و یکی از علل عمده مرگ و میر در اکثر جوامع می‌باشد. میزان شیوع دیابت در ایران بین ۳ تا ۴ درصد تخمین زده شده است (۱). به موازات پیشرفت دیابت امکان بروز عوارض ناشی از آن نظیر رتینوپاتی، نفروپاتی، نوروپاتی و آترواسکلروز افزایش می‌یابد. در اکثر موارد کنترل کامل و دقیق بیماری دیابت ناممکن است، به همین جهت تلاش می‌گردد که روش‌های بهتری برای کنترل این بیماری به‌دست آید (۱). در حال حاضر کنترل طولانی مدت غلظت گلوکز در بیماران دیابتی از طریق اندازه‌گیری هموگلوبین گلیکوزیله (HbA_{1c}) انجام می‌گیرد اما کاربرد آن دارای چندین محدودیت است. از جمله این محدودیت‌ها فقدان یک استاندارد جهانی برای اندازه‌گیری آن و اثر تداخلی سایر اشکال هموگلوبین نظیر pre-HbA_{1c}، HbF و HbS است. به علاوه روشهای مختلف اندازه‌گیری HbA_{1c} در آزمایشگاههای مختلف نتایج متفاوتی را ارائه می‌دهند، به نحوی که ضریب تغییر (CV)^۱ این اندازه‌گیری‌ها از ۳/۵٪ تا ۱۶/۵٪ متغیر است (۲).

نتایج حاصل از مطالعات اخیر حاکی از آن است که فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (IGF-I) ممکن است به‌عنوان یک زیست‌نشانگر (biomarker) برای کنترل قند خون در بیماران دیابتی مورد استفاده قرار گیرد (۳). فاکتور رشد شبه انسولین-۱ یک هورمون پلی‌پپتیدی است که از نظر توالی آمینواسیدی ۴۸٪ با پروانسولین شباهت دارد (۴). هورمون رشد از منشأ هیپوفیز سبب تولید IGF-I در کبد می‌گردد که اعمال مسبب رشد این هورمون را میانجیگری می‌کند. آثار IGF-I در متابولیسم بدن از طریق گیرنده اختصاصی IGF-I یا گیرنده انسولین اعمال می‌گردد. IGF-I به‌دلیل شباهت ساختمانی نزدیک با انسولین می‌تواند به گیرنده انسولین هم متصل شود. بسیاری از اعمال IGF-I در متابولیسم کربوهیدرات‌ها می‌تواند از طریق گیرنده انسولین صورت پذیرد. افزون بر این، گیرنده هیبرید IGF-I-انسولین هم در تعدادی از بافتها مشاهده شده است که این گیرنده هم ممکن است مسبب تعدادی از

این اعمال باشد (۵-۸). یک ویژگی بارز IGF-I که سبب تمایز آن از انسولین می‌گردد توانایی آن در اتصال با میل ترکیبی بالا به پروتئین‌های ناقلی موسوم به پروتئین متصل شونده به IGF (IGFBP) در پلاسما و مایع برون‌سلولی است که شش دسته از آنها شناخته شده‌اند. IGF-3-IGFBP فراوان‌ترین آنها است و بیشترین میل ترکیبی را با IGF-I دارد (۴).

مطالعاتی که در زمینه بررسی همبستگی بین IGF-I و HbA_{1c} انجام شده است نتایج ضد و نقیضی را ارائه داده‌اند. Dills و همکاران نشان دادند که IGF-I دارای همبستگی معکوسی با هموگلوبین گلیکوزیله است (۹)، اما Rogers و همکاران این همبستگی را فقط در دوران بلوغ مشاهده کردند (۱۰). بررسی Ekman و همکاران نشان داد که بین فاکتور رشد شبه انسولین-۱ و هموگلوبین گلیکوزیله هیچ همبستگی وجود ندارد (۳) لذا ما یک مطالعه مورد-شاهدی تحلیلی مقطعی با روش نمونه‌گیری تصادفی ساده انجام دادیم تا مشخص سازیم که آیا ارتباطی بین میزان غلظت سرمی توتال فاکتور رشد شبه انسولین-۱ و هموگلوبین گلیکوزیله در بیماران دیابتی نوع ۱ وجود دارد یا خیر.

روشها

بیست و شش بیمار دیابتی نوع ۱ (۱۵ مرد و ۱۱ زن با میانگین سنی ۲۳/۷±۹/۱ سال) مراجعه‌کننده به درمانگاه دیابت بیمارستان امام(ره) دانشگاه علوم پزشکی ارومیه که با تشخیص پزشک عوارض بارز دیابت نظیر نفروپاتی، نوروپاتی و رتینوپاتی در آنها آغاز نشده بود، به‌طور تصادفی انتخاب گردیدند. گروه شاهد شامل ۲۶ فرد سالم (۹ مرد و ۱۷ زن با میانگین سنی ۲۴/۱±۴/۴ سال) بود. تشخیص بیماران بر اساس معیار سال ۱۹۸۵ سازمان جهانی سلامت (WHO)^۲ بود (۱۱). هر دو گروه فاقد هر گونه شرایطی بودند که به نقص هورمون رشد (نظیر سوء تغذیه و بیماریهای مزمن) و یا تولید بیش از حد هورمون رشد (نظیر آکرومگالی) می‌انجامد. از این افراد که به مدت ۸ تا

² World Health Organization

¹ Coefficient of variation

ورتنس نمودیم. سپس ۱۰۰ μl از آن را به لوله‌های پوشیده‌شده از پادتن (antibody) اختصاصی اضافه نموده و ۵۰۰ μl از محلول ردیاب (tracer) (حاوی آنتی‌ژن نشاندار) به آن افزودیم. در ضمن به منظور اندازه‌گیری فعالیت رادیواکتیو تام، علاوه بر لوله‌های حاوی آنتی ژن، ۵۰۰ μl از ردیاب را در یک لوله فاقد آنتی‌ژن نیز اضافه نمودیم. سپس جالوله‌ای (rack) حاوی نمونه‌ها را به ملایمت تکان دادیم تا تمامی حبابهای موجود در لوله خارج گردند و به مدت یک شبانه‌روز در دمای اتاق نگهداری کردیم. بعد از این مدت هر یک از نمونه‌ها را با ۳ ml محلول شوینده شستشو دادیم و دو دقیقه بعد دوباره تکرار نمودیم (جهت خروج آنتی ژنهای متصل نشده به پادتن) و پس از خشک کردن، (count per minute) cpm با دستگاه شمارنده گاما (LKB، سوئد، مدل 1272) خواندیم. با استفاده از رسم منحنی cpm براساس غلظت استانداردها، که در این بررسی منحنی نزولی و قابل تأیید بود، غلظت IGF-I محاسبه گردید. لازم به ذکر است که برای مقادیر نرمال IGF-I استاندارد خاصی در دسترس نیست و در هر آزمایشی باید دامنه نرمال IGF-I تعیین گردد و نیز مقادیر نرمال IGF-I برحسب سن متفاوت است. اندازه‌گیری IGFBP-3 به شیوه ایمونورادیومتریک اسی (IRMA)^۴ (کیت شرکت Biosource، سوئیس) انجام گرفت (۴). ضرایب تغییر درون‌سنجش و برون‌سنجش جهت اندازه‌گیری IGFBP-3 سرم به ترتیب ۰/۵۶٪ و ۱/۹٪ بود. ابتدا ۱۰ μl از نمونه سرمی با ۱ ml از محلول رقیق‌کننده در دمای اتاق مخلوط گردید. در مرحله بعدی ۵۰ μl از هر یک از محلول‌های استاندارد، شاهد و مورد را به لوله‌های پوشیده شده از پادتن اختصاصی اضافه نموده و پس از آن ۴۰۰ μl از ردیاب به لوله‌های شاهد و مورد افزوده شد. ردیاب حاوی پادتن نشاندار با ید رادیواکتیو ۱۲۵ بود و برای مشخص نمودن آنتی‌ژن IGFBP-3 استفاده گردید. پس از مراحل فوق رک حاوی لوله‌ها در تکان‌دهنده (shaker) قرار داده شد و به مدت سه ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس محتویات لوله‌ها به دقت خالی و ۲ ml از محلول شوینده به هر کدام افزوده گردید. بعد از خشک شدن،

۱۲ ساعت ناشتا بودند، ۱۰ cc نمونه خون وریدی گرفته شد. اندازه‌گیری میزان گلوکز خون ناشتایی (FPG) از طریق روش آنزیمی (گلوکز اکسیداز) (کیت شرکت پارس آزمون، تهران، ایران) انجام گرفت. ضرایب تغییر درون‌سنجش و برون‌سنجش جهت اندازه‌گیری FPG به ترتیب ۱/۷۴٪ و ۴/۹٪ بود. روش کالریمتری سازمان جهانی سلامت (WHO) (۱۲) برای اندازه‌گیری هموگلوبین گلیکوزیله (کیت شرکت مهسایاران، تهران، ایران) استفاده گردید. ابتدا ۵ میلی‌لیتر از نمونه خون وریدی در یک لوله آزمون CBC^۱ حاوی ۱۰۰ μl محلول ۱۰٪ EDTA^۲ ریخته شد و در دمای ۲-۶ درجه سلسیوس نگهداری گردید. ابتدا هموگلوبین (Hb) تام اندازه‌گیری شد. به همین منظور هموگلوبین تحت اثر معرف درابکین، که حاوی پتاسیم فری سیانید است، به سیانو مت‌هموگلوبین تبدیل گردید، سپس جذب نوری آن در ۵۴۰ nm خوانده شد و از روی منحنی استاندارد، غلظت هموگلوبین تام به دست آمد. جهت اندازه‌گیری HbA_{1c}، ابتدا تحت اثر اسید استیک هیدرولیز گردیده و به ۵-هیدروکسی متیل فورفورال (5-HMF) تبدیل شد. سپس پروتئینهای موجود در محیط به وسیله معرف رسوب‌دهنده رسوب داده شد و بعد قسمت رویی با یک معرف رنگزا واکنش داده و جذب نوری آن در ۴۴۳ نانومتر خوانده شد. با استفاده از 5-HMF به عنوان استاندارد غلظت HbA_{1c} برحسب درصد (نسبت به Hb تام) به دست آمد. غلظت HbA_{1c} در افراد نرمال در محدوده ۵٪ تا ۸٪ متغیر است. در افراد دیابتی $HbA_{1c} < 9\%$ بیانگر کنترل خوب دیابت است و از طرفی $HbA_{1c} < 9\%$ بیانگر کنترل متوسط دیابت است در حالی که HbA_{1c} بیشتر از ۱۱٪ نشان دهنده این است که کنترل دیابت به خوبی صورت نگرفته است. برای اندازه‌گیری IGF-I از روش رادیوایمونواسی (RIA)^۳ (کیت شرکت Biosource، سوئیس) استفاده شد (۴). ضرایب تغییر درون‌سنجش و برون‌سنجش جهت اندازه‌گیری IGF-I سرم به ترتیب ۶/۱٪ و ۹/۹٪ بود. به همین منظور ابتدا ۵۰ μl از سرم نمونه‌های مورد یا شاهد را به ۱ ml بافر رقیق‌کننده افزودیم و شدیداً

¹ Complete blood count

² Ethylenediaminetetraacetic acid

³ Radioimmunoassay

⁴ Immunoradiometric assay

جدول ۱- مقایسه سطوح متوسط سرمی IGF-I، FPG، HbA_{1c}، IGFBP-3 در گروههای مورد و شاهد

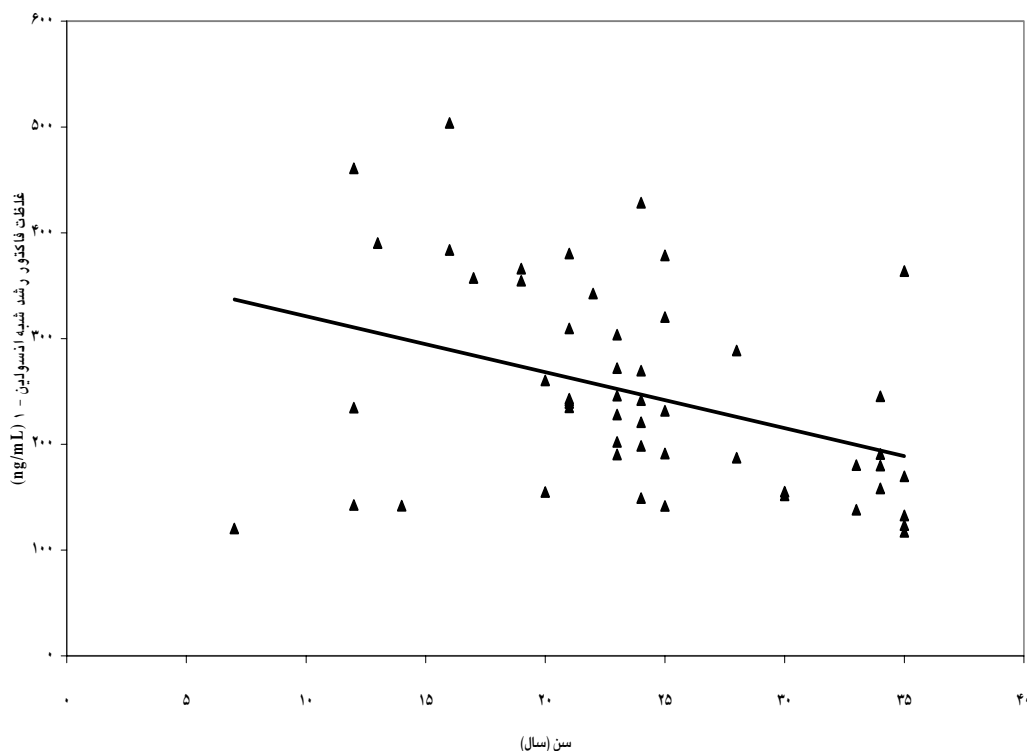
P	بیماران (تعداد=۲۶)	شاهد (تعداد=۲۶)	متغیر
	انحراف استاندارد ± میانگین	انحراف استاندارد ± میانگین	
<۰/۰۰۱	۱۸۶/۸۱±۹۷/۲۷	۹۵/۳۸±۱۱/۲۹	FPG(mg/dl)
<۰/۰۰۱	۹/۶۹ ±۱/۵۹	۴/۶۳ ±۱/۲۸	HbA _{1c} (%)
<۰/۰۰۵	۲۲۰/۸۰±۱۱۰/۶۴	۲۷۳/۸۶ ±۷۳/۷۰	IGF-I (ng/ml)
>۰/۰۰۵	۳۴۹۶/۹۹±۱۰۱۷/۰۹	۳۳۳۴/۷۷±۵۳۳/۹۴	IGFBP-3(ng/ml)

گردید. محاسبات آماری با استفاده از نسخه ۹ نرم افزار SPSS انجام شد.

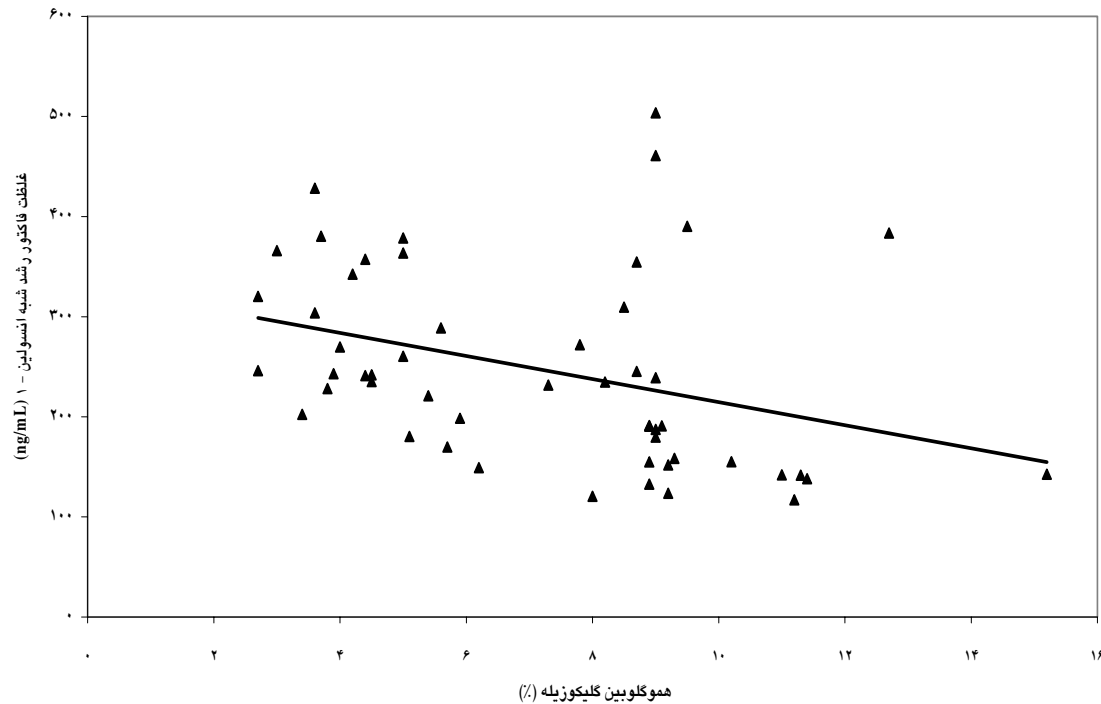
یافته‌ها

کل افراد مورد بررسی در این مطالعه ۵۲ نفر بودند که ۲۶ نفر در گروه مورد و ۲۶ نفر در گروه شاهد تحت مطالعه قرار گرفتند. میانگین غلظتهای IGF-I، FPG، HbA_{1c} و IGF-I در این دو گروه اندازه‌گیری شد. میانگین غلظت

cpm آنها در دستگاه شمارنده گاما خوانده شد. در مورد IGF-I نیز همانند IGF-I تاکنون مقادیر استاندارد نرمال تعیین نشده است و در هر آزمایشی باید دامنه نرمال تعیین گردد. از آزمون t مزدوج جهت مقایسه میانگین‌های کمی بین دو گروه مورد و شاهد استفاده گردید. ضرایب همبستگی (r) با استفاده از آنالیز همبستگی پیرسون به دست آمد. اختلاف آماری به میزان P<۰/۰۰۵ دودنباله، معنی‌دار در نظر گرفته شد. تمام نتایج به صورت \pm میانگین گزارش



شکل ۱- همبستگی غلظت فاکتور رشد شبه انسولین - I در مقابل سن



شکل ۲- همبستگی غلظت فاکتور رشد شبه انسولین - ۱ در مقابل هموگلوبین گلیکوزیله

بحث

مطالعه ما نشان داد که میانگین غلظت تام IGF-I سرم در بیماران دیابتی نوع ۱ به طور معنی داری پایین تر از افراد شاهد بود. مطالعه ما همچنین همبستگی معکوسی بین IGF-I و HbA_{1c} نشان داد. Dills و همکاران ارتباط بین IGF-I و هموگلوبین گلیکوزیله را در ۱۳۷ فرد مبتلا به دیابت نوع ۱ تازه تشخیص داده شده با میانگین سنی ۸/۵±۴/۵ سال طی یک مطالعه همگروهی (cohort) در مدت ۳-۱۱ ماه بررسی نمودند (۹). مطالعه آنها نشان داد که IGF-I دارای همبستگی مستقیم با سن بوده اما با هموگلوبین گلیکوزیله دارای همبستگی معکوس است. آنها همچنین مشاهده کردند که میانگین غلظت IGF-I در دختران بیشتر از پسران است. برای بررسی همبستگی میان عوامل سن و جنس و غلظت IGF-I باید این نکته را مد نظر قرار داد که هورمون رشد (GH)^۱ عمده ترین عامل تعیین کننده غلظت IGF-I در پلاسما است و غلظت GH وابسته به سن است. در کودکان مبتلا به نقص هورمون

FPG در بیماران دیابتی به طور معنی داری بالاتر از افراد شاهد بود ($P < 0.001$) (جدول ۱). میانگین سطح HbA_{1c} نیز در بیماران دیابتی به طور معنی داری بالاتر از افراد شاهد بود ($P < 0.001$) (جدول ۱) اما میانگین غلظت تام IGF-I در بیماران به طور معنی داری پایین تر از افراد شاهد بود ($P < 0.05$) (جدول ۱). بین میانگین غلظت تام IGF-BP-3 در افراد دیابتی و افراد شاهد تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P > 0.05$) (جدول ۱). میانگین غلظت تام IGF-I در مردان ($243/4 \pm 106/6$ ng/mL) با میانگین غلظت IGF-I در زنان ($250/6 \pm 89/5$ ng/mL) تفاوت معنی داری نشان نداد ($P > 0.05$). غلظتهای تام IGF-I بیماران با سن همبستگی منفی معنی داری داشت ($r = -0.39$ و $P < 0.005$) (شکل ۱). همبستگی معنی داری بین غلظتهای IGF-I و FPG دیده نشد ($P > 0.05$). همبستگی معکوس معنی داری بین مقادیر IGF-I و HbA_{1c} مشاهده گردید ($P < 0.01$) (شکل ۲) ($r = -0.35$).

¹ Growth hormone

ارتباط بین IGF-I و سن در مطالعه ما نظیر بررسی Ekman و همکاران بود. اما ارتباط بین IGF-I و هموگلوبین گلیکوزیله در مطالعه ما، برخلاف بررسی Ekman و همکاران، معنی‌دار بود.

پروتئین IGFBP-3 پروتئین اصلی حامل IGF-I در جریان خون است که به‌عنوان یک ذخیره برای IGF-I نیز عمل می‌کند (۴). بنابراین غلظت سرمی تام این پروتئین را نیز مورد بررسی قرار دادیم که بین دو گروه مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری به‌دست نیامد. بنابراین پایین بودن میانگین غلظت تام IGF-I در گروه مورد نسبت به گروه شاهد را نمی‌توان به کاهش غلظت تام پروتئین IGFBP-3 نسبت داد. در مطالعه Ekman و همکاران بررسی پروتئین IGFBP-3 صورت نگرفت که این مسأله یک وجه تمایز تحقیق ما با آن مطالعه است. البته یکی از محدودیت‌های مطالعه ما تعداد کم نمونه بود که باید مد نظر قرار گیرد. در مطالعه ما بین مقادیر HbA_{1c} و IGF-I همبستگی معنی‌داری ملاحظه گردید. برای به دست آوردن مقادیر عددی دقیق IGF-I بر اساس مقادیر HbA_{1c} و استفاده از IGF-I جهت کنترل قند خون، پژوهش‌های گسترده‌تری با تعداد نمونه بیشتر و مطالعه‌ای آینده‌نگر پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

بر خود لازم می‌دانیم که از همکاری تمام کارکنان آزمایشگاه کلینیک دیابت دانشگاه علوم پزشکی ارومیه و آزمایشگاه تحقیقاتی بیوشیمی مولکولی و RIA مرکز تحقیقات کاربردی دارویی تبریز تشکر و قدردانی نماییم.

رشد معمولاً غلظت IGF-I نیز پایین است (۱۳). در تحقیق Dills و همکاران که بر روی افراد مبتلا به دیابت نوع ۱ با میانگین سنی حدود ۸ سال انجام گرفت، غلظت‌های IGF-I در دختران بالاتر از پسران بود. در حالی‌که در مطالعه ما افراد تحت بررسی مرحله بلوغ را پشت سر گذاشته بودند. میانگین غلظت‌های IGF-I تفاوت معنی‌داری را بین مردان و زنان نشان نداد. نتایج این مطالعه نشان داد که احتمالاً پس از گذراندن مرحله بلوغ، غلظت IGF-I تابع جنسیت نخواهد بود. به علت اینکه غلظت GH به صورت وابسته به سن تغییر می‌کند، سن می‌تواند یک عامل مهم تعیین‌کننده غلظت IGF-I باشد. غلظت IGF-I در زمان تولد خیلی پایین و در حدود ۲۰-۶۰ ng/mL است و در زمان بلوغ غلظت آن به حد ۶۰۰-۱۱۰۰ ng/mL افزایش می‌یابد. در دهه دوم زندگی غلظت IGF-I به سرعت پایین می‌آید، به طوری که در ۲۰ سالگی به حدود ۳۵۰ ng/mL می‌رسد و سپس در طی هر دهه به تدریج به کاهش خود ادامه می‌دهد (۱۳، ۱۴). در مطالعه ما نیز غلظت IGF-I همبستگی معکوس معنی‌داری با سن نشان داد که چون بیشتر جمعیت آماری مورد مطالعه در سنین پس از بلوغ بودند، این رابطه مشابه با نتایج مطالعات قبلی بود (۳، ۱۴). Ekman و همکاران همبستگی بین غلظت سرمی IGF-I و هموگلوبین گلیکوزیله را در بیماران دیابتی نوع ۱ با محدوده سنی ۲۰-۶۰ سال بررسی نمودند (۳). آنها مشاهده کردند که میانگین غلظت سرمی IGF-I در بیماران کمتر از گروه شاهد است. همچنین نتیجه گرفتند که بین غلظت IGF-I و سن همبستگی معکوسی وجود دارد، اما بین IGF-I و هموگلوبین گلیکوزیله همبستگی وجود ندارد.

مآخذ

1. King H, Aubert RE, Herman. WHO Global burden of diabetes 1995-2025. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-31.
2. Weykamp CW, Penders TJ, Miedema K, Muskiet FA, van der Slik W. Standardization of glycohemoglobin results and reference values in whole blood studied in 103 laboratories using 20 methods. *Clinical Chemistry* 1995; 41: 82-6.
3. Ekman B, Nystrom F, Arnqvist HJ. Circulating IGF-I concentrations are low and not correlated to glycaemic control in adults with type 1 diabetes. *European Journal of Endocrinology* 2000; 143: 505-10.
4. Janssen JA, Jacobs ML, Derckx FH, Weber RF, van der Lely AJ, Lamberts SW. Free and total insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding protein-1 (IGFBP-1), and IGFBP-3 and their relationships to the presence of diabetic retinopathy and glomerular hyperfiltration in insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82: 2809-15.

5. Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrine Reviews* 1994; 15: 80-101.
6. Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the USA* 1999; 96: 7324-9.
7. Holt RIG, Simpson HL, Sonksen PH. The role of the growth hormone-insulin-like growth factor axis in glucose homeostasis. *Diabetic Medicine* 2003; 20: 3-15.
8. Clemmons DR, Moses AC, McKay MJ, Sommer A, Rosen DM, Ruckle J. The combination of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein-3 reduces insulin requirements in insulin-dependent type 1 diabetes: evidence for in vivo biological activity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85: 1518-24.
9. Dills DG, Allen C, Palta M, Zaccaro DJ. Insulin-like growth factor-I is related to glycemic control in children and adolescents with newly diagnosed insulin-dependent diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995; 80: 2139-43.
10. Rogers DG, Sherman LD, Gabbay KH. Effect of puberty on insulinlike growth factor I and HbA1c in type I diabetes. *Diabetes Care* 1991; 14: 1031-5.
11. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus. *Technical Report Series 727*. World Health Organisation; 1985.
12. Alberti KG MM, Skrabalo Z. Standardization of biochemical methods in the diagnosis and management of diabetes with particular reference to developing countries. *WHO/IDF Bulletin* 1982; 1-3.
13. Rudman DG, Kutner MH. Impaired growth hormone secretion in the adult population: relation to age and adiposity. *Journal of Clinical Investigation* 1981; 67: 1361-76.