

مقاله پژوهشی

ارتباط بین فاکتور رشد شبہ 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 خسروبیگی: 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 نفروپاتی 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 شبہ انسولین-۱ (IGF-I)^۱ 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 23.7 ± 9 سال) تازه تشخیص داده شده که فاقد عوارض پیشرفتی این بیماری بودند انجام شد. گروه شاهد شامل ۲۶ فرد سالم (۹ مرد و ۱۷ زن با میانگین سنی 24.1 ± 4 سال) بود. میزان گلوکز ناشتاپی پلاسمای (FPG)^۲ با استفاده از روش آنزیمی (گلوکز اکسیداز) و HbA_{1c} به روش کالریمتری اندازه گیری شدند. IGF-I و پروتئین شماره ۳ متصل شونده به آن (IGFBP-3)^۳ به طریق ایمونوآسی اندازه گیری 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 به خوبی 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 به طور غیرمستقیم به عنوان نشانگر میزان کنترل قند خون در دیابت استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: دیابت نوع ۱، HbA_{1c} ، IGF-I، گلوکز ناشتاپی پلاسمای

¹ Insulin-like growth factor-I

² Fasting plasma glucose

³ IGF binding protein-3

*نشانی:

تبریز،

دانشگاه علوم پزشکی

تبریز،

مرکز کاربردی علوم دارویی

زمه

مقدمه

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. IGFBP-3، 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 23.7 ± 9.1 سال) مراجعه کننده به درمانگاه دیابت بیمارستان امام(ره) دانشگاه علوم پزشکی ارومیه که با تشخیص پزشک عوارض بارز دیابت نظری نفروپاتی، نوروپاتی و رتینوپاتی در آنها آغاز نشده بود، به طور تصادفی انتخاب گردیدند. گروه شاهد شامل ۲۶ فرد سالم (۹ مرد و ۱۷ زن) با میانگین سنی 24.1 ± 4.4 سال) بود. تشخیص بیماران بر اساس معیار سال ۱۹۸۵ سازمان جهانی سلامت (WHO)^۲ بود (۱۱). هر دو گروه قادر هر گونه شرایطی بودند که به نقص هورمون رشد (نظری سوء تغذیه و بیماری‌های مزمن) و یا تولید بیش از حد هورمون رشد (نظری آکرومگالی) می‌انجامد. از این افراد که به مدت ۸ تا

دیابت شایعترین بیماری غدد درون ریز در انسان است و یکی از علل عمدۀ 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 نظری 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 به دست آید (۱). در حال حاضر کنترل طولانی مدت غلظت گلوكز 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 نظری pre-HbF، HbS و HbA_{1c} در آزمایشگاه‌های مختلف نتایج اندازه‌گیری HbA_{1c} را ارائه می‌دهند، به نحوی که ضریب تغییر (CV)^۱ این اندازه‌گیری‌ها از 3.5% تا 16.5% متغیر است (۲).

نتایج حاصل از مطالعات اخیر حاکی از آن است که فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (IGF-I) ممکن است به عنوان یک زیست‌نشانگر (biomarker) برای کنترل قند خون در بیماران دیابتی مورد استفاده قرار گیرد (۳). فاکتور رشد شبه انسولین-۱ یک هورمون پلی‌پتیدی است که از نظر توالی آمینواسیدی 48% 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 به دلیل شباهت ساختمانی نزدیک با انسولین می‌تواند به گیرنده انسولین هم متصل شود. بسیاری از اعمال IGF-I در متابولیسم کربوهیدرات‌ها می‌توانند 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

² World Health Organization

¹ Coefficient of variation

ورتکس نمودیم. سپس $100\mu\text{l}$ از آن را به لوله‌های پوشیده شده از پادتن (antibody) اختصاصی اضافه نموده و $500\mu\text{l}$ از محلول ردیاب (tracer) (حاوی آنتیژن نشاندار) به آن افزودیم. در ضمن به منظور اندازه‌گیری فعالیت رادیواکتیو تام، علاوه بر لوله‌های حاوی آنتیژن، $500\mu\text{l}$ 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 3ml محلول شوینده شستشو دادیم و دو دقیقه بعد دوباره تکرار نمودیم (جهت خروج آنتیژنهای متصل نشده به پادتن) و پس از خشک کردن، cpm (count per minute) 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-I استاندارد خاصی در دسترس نیست و در هر آزمایشی باید دامنه نرمال IGF-I تعیین گردد و نیز مقادیر نرمال-IGFBP-3 برحسب سن متفاوت است. اندازه‌گیری IGFBP-3 به شیوه ایمونورادیومتریک اسی (IRMA)⁴ (کیت شرکت Biosource، سوئیس) انجام گرفت (۴). ضرایب تغییر درون‌سنجد و بروون‌سنجد جهت اندازه‌گیری IGFBP-3 درون‌سنجد و بروون‌سنجد جهت اندازه‌گیری شوینده به هر کدام افزوده گردید. بعد از خشک شدن،

۱۲ ساعت ناشتا بودند، 10cc نمونه خون وریدی گرفته شد. اندازه‌گیری میزان گلوکز خون ناشتابی (FPG) از طریق روش آنزیمی (گلوکز اکسیداز) (کیت شرکت پارس آزمون، تهران، ایران) انجام گرفت. ضرایب تغییر درون‌سنجد و بروون‌سنجد جهت اندازه‌گیری FPG به ترتیب $1/74\%$ و $4/9\%$ بود. روش کالریمتری سازمان جهانی سلامت (WHO) (۱۲) برای اندازه‌گیری هموگلوبین گلیکوزیله (کیت شرکت مهساپاران، تهران، ایران) استفاده گردید. ابتدا 5 میلی لیتر از نمونه خون وریدی در یک لوله آزمون CBC^1 (حاوی 10ml محلول 10% EDTA²) ریخته شد و در دمای $6-2$ 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 540nm 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 $5\text{-هیدروکسی متیل فورفورال}$ (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 443 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 5% تا 8% متغیر است. در افراد دیابتی $<9\%$ HbA_{1c} بیانگر کنترل خوب دیابت است و از طرفی $>11\%$ HbA_{1c} بیانگر کنترل متوسط دیابت است در حالی که HbA_{1c} بیشتر از 11% نشان دهنده این است که کنترل دیابت به خوبی صورت نگرفته است. برای اندازه‌گیری IGF-I روش رادیوایمونوآسی (RIA)³ (کیت شرکت Biosource، سوئیس) استفاده شد (۴). ضرایب تغییر درون‌سنجد و بروون‌سنجد جهت اندازه‌گیری IGF-I سرم به ترتیب $1/61$ و $9/9\%$ بود. به همین منظور ابتدا 1ml از سرم نمونه‌های مورد یا شاهد را به 1ml بافر رقیق‌کننده افزودیم و شدیداً

¹ Complete blood count

² Ethylenediaminetetraacetic acid

³ Radioimmunoassay

⁴ Immunoradiometric assay

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

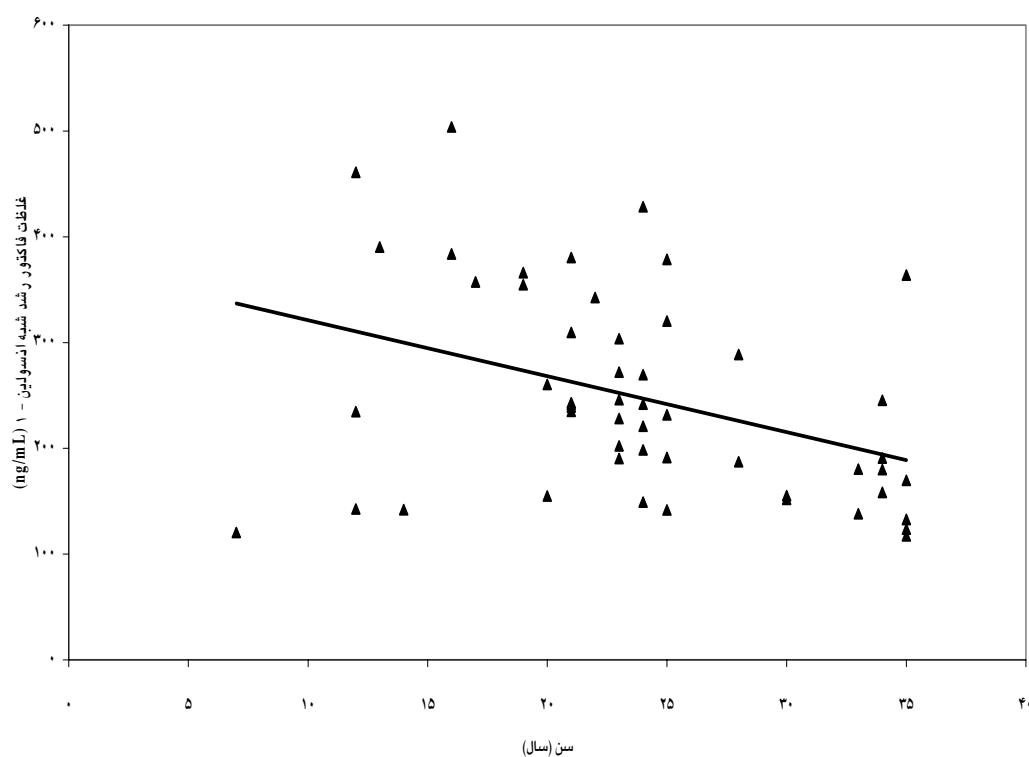
P	بیماران (تعداد=۲۶)	شاهد (تعداد=۲۶)	متغیر
	انحراف استاندار ± میانگین	انحراف استاندار ± میانگین	
<0.001	۱۸۶/۸۱±۹۷/۲۷	۹۵/۳۸±۱۱/۲۹	FPG(mg/dl)
<0.001	۹/۶۹±۱/۵۹	۴/۶۳±۱/۲۸	HbA _{1c} (%)
<0.05	۲۲۰/۸۰±۱۱۰/۶۴	۲۷۳/۸۶±۷۳/۷۰	IGF-I (ng/ml)
>0.05	۳۴۹۶/۹۹±۱۰۱۷/۰۹	۳۳۳۴/۷۷±۵۳۳/۹۴	IGFBP-3(ng/ml)

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

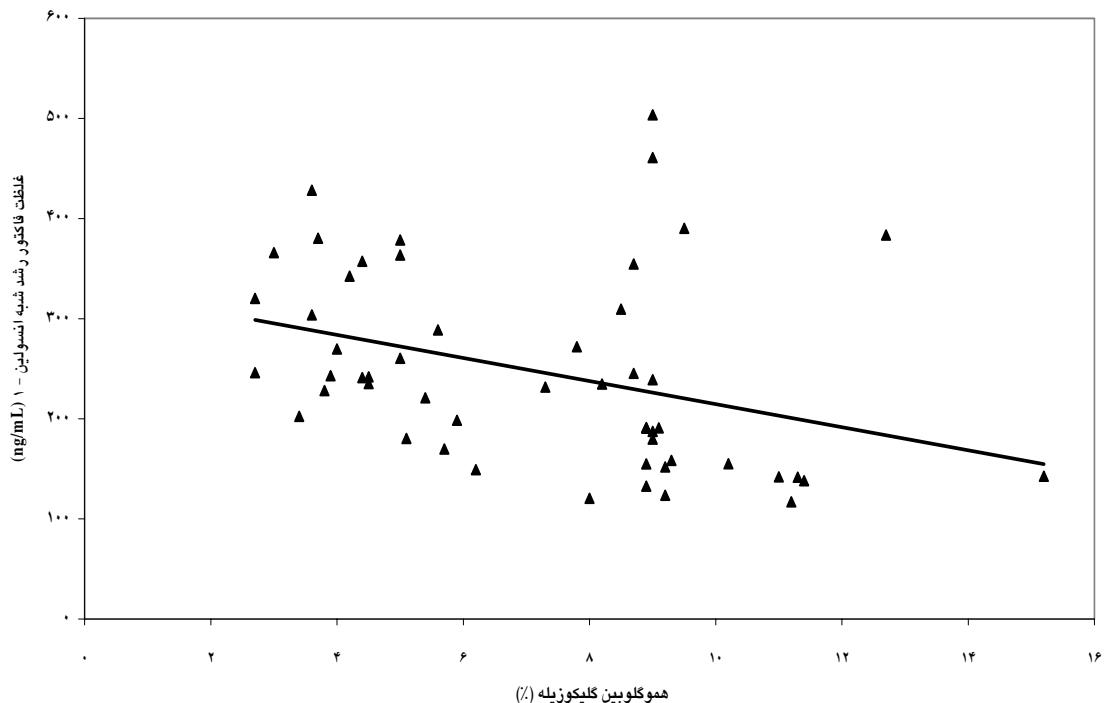
یافته‌ها

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 غلظتهاي IGF-I, HbA_{1c}, FPG و IGFBP-3 در اين دو گروه اندازه‌گيری شد. میانگين غلظت

آنها در دستگاه شمارنده گاما خوانده شد. در مورد IGFBP-3 نيز همانند IGF-I تاكنون مقادير استاندارد نرمال تعين نشده است و در هر آزمایشي باید دامنه نرمال تعين گردد. از آزمون t مزدوج جهت مقایسه میانگین‌های کمی بين دو گروه مورد و شاهد استفاده گردید. ضرائب همبستگی (r) با استفاده از آنالیز همبستگی پیرسون به دست آمد. اختلاف آماری به میزان $P<0.05$ دودناله، معنی دار در نظر گرفته شد. تمام نتایج به صورت SD میانگین گزارش



شکل ۱- همبستگی غلظت فاکتور رشد شبه انسولین - ۱ 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 دیابت نوع ۱ تازه تشخیص داده شده با میانگین سنی ۸/۵±۴/۵ سال طی یک مطالعه همگروهی (cohort) در مدت ۱۱-۳ 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 همبستگی 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 عمدترين عامل تعیین‌کننده 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 IGFBP-3 در افراد دیابتی و افراد شاهد تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P>0/05$) (جدول ۱). میانگین غلظت تام IGF-I در مردان ($243/4\pm10/6$ ng/mL) با میانگین غلظت IGF-I در زنان ($250/6\pm8/5$ ng/mL) تفاوت معنی داری نشان نداد ($P>0/05$). غلظتهاي تام IGF-I بیماران با سن همبستگي منفي معنی داری داشت ($P<0/005$ و $r=-0/39$) (شکل ۱). همبستگي معنی داری بين غلظتهاي IGF-I و FPG ديده نشد ($P>0/05$). همبستگي معکوس معنی داری بين مقادير IGF-I و HbA_{1c} مشاهده گردید ($P<0/01$ و $r=-0/35$) (شکل ۲).

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، معنی دار بود.

پروتئین IGFBP-3 پروتئین اصلی حامل IGF-I در جریان خون است که به عنوان یک ذخیره برای IGF-I نیز عمل می‌کند (۴). بنابراین غلظت سرمی تام این پروتئین را نیز مورد بررسی قراردادیم که بین دو گروه مورد مطالعه تفاوت معنی داری به دست نیامد. بنابراین پایین بودن میانگین غلظت تام IGF-I در گروه مورد نسبت به گروه شاهد را نمی‌توان به کاهش غلظت تام پروتئین-3 IGFBP-3 نسبت داد. در مطالعه Ekman و همکاران بررسی پروتئین IGFBP-3 صورت نگرفت که این مسئله 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 معنی داری 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، غلظتهاي IGF-I در دختران بالاتر از پسران بود. در حالی که در مطالعه ما افراد تحت بررسی مرحله بلوغ را پشت سر گذاشته بودند. میانگین غلظتهاي IGF-I تفاوت معنی داری 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 ۳۵۰ ng/mL می‌آید، به طوری که در ۲۰ سالگی به حدود ۲۰ 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 معنی داری با سن نشان داد که چون پیشتر جمعیت آماری مورد مطالعه در سنین پس از بلوغ بودند، این رابطه مشابه با نتایج مطالعات قبلی بود (۱۴، ۳).

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.

مأخذ

- King H, Aubert RE, Herman. WHO Global burden of diabetes 1995-2025. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-31.
- 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.
- 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.
- Janssen JA, Jacobs ML, Derkx 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.