

GLİKOZİLLENMİŞ HEMOGLOBİNİN KOLORİMETRİK TAYİNİ

Dr. Ebubekir Bakan (x)
Dr. E. Edip Keha (xx)
Dr. Teksin Eryılmaz (xxx)
Arş. G. Nuri Bakan (xxxx)

ÖZET:

Hemoglobinin glukoz bağlamasına glikozillenme denir. Beta zincirindeki birinci amino asit valinin amino grubu ile glukoz arasında nonenzimatik bimoleküler bir kondensasyon reaksiyonu sonucu kararsız bir Schiff bazı oluşur. Bu kararsız yapı Amadori düzenlenmesi ile kararlı bir ketoamine dönüşür. Bu ketoamin, hemoglobinin kolon kromatografisinde HbA_{1c} fraksiyonunu oluşturur. Bu çalışmada modifiye bir kolorimetrik metod kullanılarak 10 sağlıklı ve 10 diyabetli kişide glikozillenmiş hemoglobin tayin edildi. Diyabetlilerde (19±6) ve kontrol grubunda (4,9±1,9) % HbA_{1c} değerleri istatistik açıdan önemli (P<0,001) fark göstermektedir. Diyabetli hastalarda açlık kan glukozu ile HbA_{1c} arasındaki önemli korelasyon (r=0,90; P<0,001) glikozilasyonun yüksek kan glukozu ile ilgili olduğunu gösteriyor.

GİRİŞ

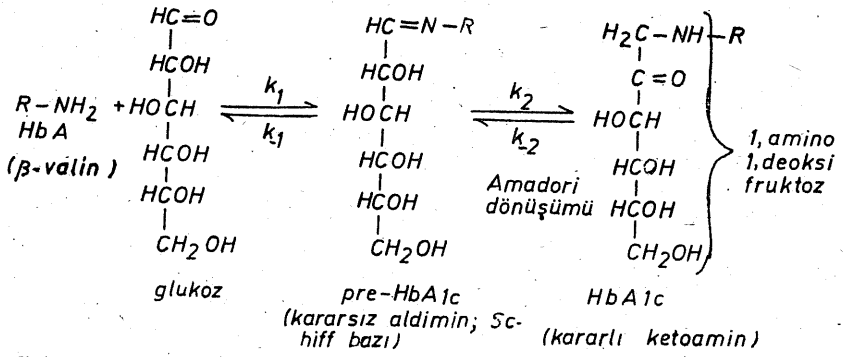
Normal hemoglobinin (HbA) glukoz bağlamasına glikozillenme denir ve bu glikozillenmiş hemoglobin (GHb) veya HbA_{1c} olarak (1) bilinmektedir. Glikozilasyon reaksiyonu bimoleküler bir kondensasyon reaksiyonudur. Hemoglobinin β-zincirindeki birinci aminoasit valinin- NH₂ grubu ile glukoz arasında bir Schiff bazı meydana gelir (2). Meydana gelen oldukça kararsız bu aldimin, Amadori düzenlenmesi ile (3) kararlı bir yapı olan ketoamine (HbA_{1c}) dönüşür (4) (Şekil-1). Biyokinetik bir model kullanılarak (5) aldimin oluşumunun ketoamin oluşumundan 60 kat daha hızlı olduğu tesbit edilmiştir. Enzimatik olmayan bu glikolizasyon reaksiyonu çok yavaş yürür. Ancak HbA_{1c} sentezi eritrositin yaklaşık 120 günlük ömrü boyunca devam eder (2).

(x) A.Ü. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Uz.

(xx) Doç.Dr. A.Ü. Fen-Ed. Fak. Biyokimya Bölümü

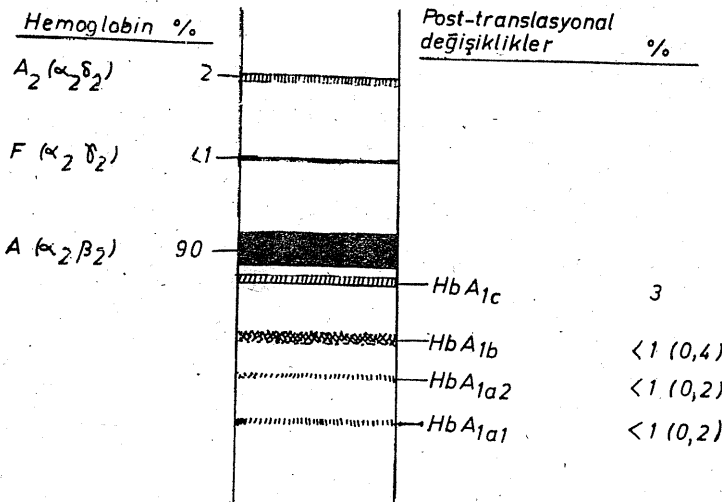
(xxx) Doç.Dr. A.Ü. Tıp Fak. Göz Hastalıkları Kliniği

(xxxx) Ar. Gör. A.Ü. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı



Şekil- 1 : Hemoglobinin glikozillenme reaksiyonları
 (R=Hemoglobinin β zinciri; $k_1 = 0,096 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
 $k_1 = 0,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; $k_2 = 14,2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$; $k_2 = 1,7 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$)

Normal bir insan eritrositinde bulunan Hb tipleri, yaklaşık yüzde oranları ile birlikte şekil-2 de verilmiştir. jel elektrodaqlama metoduyla veya kolon kromatografisi ile ayrıldıklarında en hızlı yürüyen dört fraksiyona (HbA_{1c}, HbA_{1b}, HbA_{1a2}, HbA_{1a1}) "hızlı hemoglobinler denir ve bunlar negatif yüklüdürler. Bu hemoglobinlerden sadece HbA_{1c} nin yapısı kesin olarak bilinmektedir. Glikozillenmiş hemoglobinlerle HbA arasındaki tek fark NH₂- taşıyan amino asidlerin glukoz bağlanmış olmasıdır. Hb A_{1c} için söz konusu olan β-zincirindeki amino



Şekil- 2 : Normal eritrositlerdeki hemoglobin bileşenleri (jel elektrodaqlama metoduna göre)

grup substitusyonu pH 7 civarında müstakil bir kromatografik fraksiyon oluşturabilecek pK değişimi göstermektedir (6). Başka bir deyişle bu amino grubu Schiff bazı kondensasyonu için nükleofilik bir özellik kazandırır (7).

Hb glikozilasyonundaki artma kan glukozu konsantrasyonundaki artmayı, azalma da eritrosit ömrünün kısalığını göstermektedir (8). Bu bakımdan, kan glukoz seviyesinin uzun süre yüksek olduğu diyabetli hastalarda HbA_{1c} sentezi artmaktadır. Diğer taraftan, eritrosit ömrünün kısa olduğu durumlarda (hemolitik anemi) GHb sentezi azalır (9). Genç eritrositlerde GHb yüzdesinin normale göre düşük olması (10) da bu düşüncüyü desteklemektedir.

Bu çalışmada, Parker ve arkadaşlarının (11) kolorimetrik metodunda küçük modifikasyonlar yapılarak HbA_{1c} tayin edildi. Metodun esası kısaca şöyledir: HbA_{1c} deki ketoamin 1-deoksi, 1-amino-, fuktoz kısmı seyreltik zayıf asitli (okzalik asit) ortamda hidroliz edilerek 5- hidroksimetil furaldehide (HMF) dönüştürülür. Bu da 2-tiyobarbutirik asitle (TBA) renklendirilerek 443 nm'de absorbans ölçülür. Sonuçlar, hazırlanan bir fruktoz veya HMF standart egrisinden değerlendirilir.

MATERYAL VE METOD

Sağlıklı 10 kişiden ve diyabet tanısı konmuş 10 hastadan heparinize enjektörle 5 ml kadar açlık kanı alındı. Açlık kan şekeri (AKŞ) glukoz okzidaz metoduyla (Boehringer GOD-Perid, Lot no 640010 02 kiti ile) ve Hb siyanmethemoglobin metoduyla tayin edildi. HbA_{1c} tayini bu kandan izole edilen eritrositlerde yapıldı,

A- Kullanılan Çözeltiler

Okzalik Esit (0,5 mol/L): 6,3 gr okzalik asit redistile suda eritilir, litreye tamamlanır (oda sıcaklığında iki hafta kararlı).

TBA (0,05 mol/L): 0,271 gr 2-tiyobarbutirik asit redistile suda eritilir ve 100 ml'ye tamamlanır. pH'sı 5 M NaOH ile 6,0 ayarlanır. Bu çözelti 4°C'da 3 ay kadar kararlıdır.

Triklorasetik asit (TCA, 400 gr/L): 40 gr TCA suda eritilir ve 100 ml'ye tamamlanır.

Fizyolojik tuzlu su (FTS, 0,15 mol/L): 8,76 gr NaCl, suda eritilir, litreye tamamlanır.

HMF (stok, 100 µmol/L): 12,6 mg HMF (Sigma. Chemical Co. H-9877) FTS'da eritilir ve litreye tamamlanır (-20°C'da 3 ay kararlı). Bu stok standart. 10-80 µmol/L ye FTS ile seyreltilerek bir seri standart hazırlanır.

Fruktoz (stok, 1 mmol/L): 0,18 gr fruktoz (Eastman Org. Chem. S. 0354), FTS'da eritilir ve hacmi litreye tamamlanır (4°C'da bir hafta kararlı). HMF standardında olduğu gibi bu stoktan da aynı seyreltmeler yapılarak çalışma standartları hazırlanır.

B- Hemolizat Hazırlanması:

Yaklaşık 2 ml kadar heparinize kan santrifüj edildikten sonra (800xg, 10 dak) plazma uzaklaştırıldı. Kalan eritrosit paketi üzerine 5 ml kadar FTS eklendi. altüst edilerek karıştırıldı ve santrifüj edildi (800xg, 10 dak). Yıkama sıvısı atıldı. Bu yıkama işlemi 2 defa daha tekrarlandı. Eritrositler, elde edilen paket hacminin iki katı soğuk redistile su ile karıştırılarak hemoliz edildi. Lipidleri uzaklaştırmak için (12) 0,5 ml karbondetetraklorür eklendi ve 1500xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Berrak hemolizat dikkatlice alınarak bunda Hb tayin edildi. Bu emolizat, 10 gr/L Hb içerecek şekilde su ile seyreltildi. Seyreltik numune daha uzun süre saklanabildiğinden dolayı 2 ml seyreltilmiş hemolizat, kapaklı tüpte ve -20°C'da, deney yapılacağı güne kadar (yaklaşık bir hafta) saklandı (13).

C- Glikozillenmiş Hemoglobulin Tayini

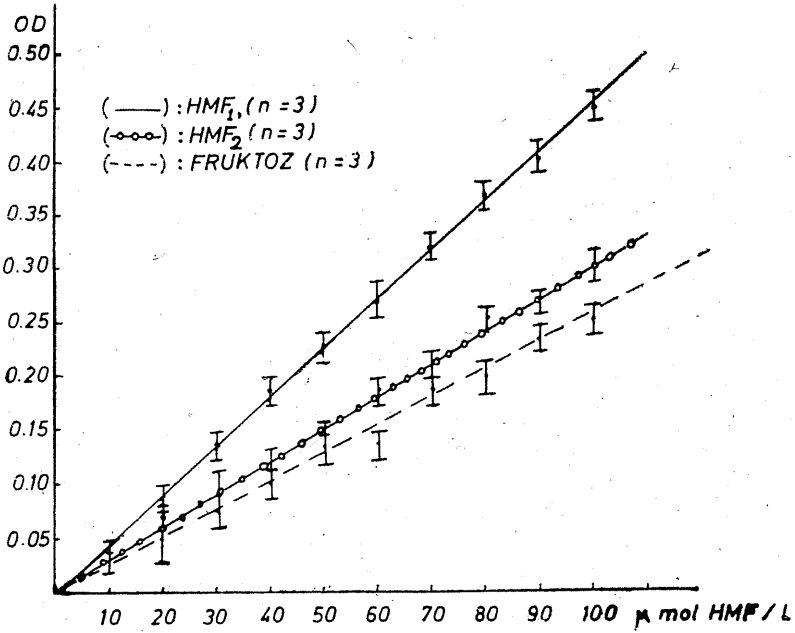
Dondurulmuş hemolizat oda sıcaklığına getirildikten sonra üzerine 2 ml oksalik asit çözeltisi eklendi. Tüp iyice karıştırıldı ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra otoklava (Marsh Inst. Co., 0-150°C, 0-4 lb/in²) yerleştirildi. Otoklavın sıcaklığı 124°C (± 1)'a (124kPa) geldikten sonra bu sabit sıcaklıkta 60 dakika süreyle inkübe edildi. Bu hidroliz basamağından sonra tüp oda sıcaklığına kadar soğutuldu, altüst edildikten sonra 2 ml TCA eklendi. 5 dak. bekletildi (14). Çöken proteinler, cam yünü ile doldurulmuş 10x1 cm'lik cam kolondan geçirildi. Berrak olmayan süzüntüler santrifüj edildi. İki kolorimetre tüpünden her birine bu süzüntüden 1.5 ml konuldu. Bunlardan birine 0,5 ml redistile (Numune körü: NK), diğerine (numune: N) 0,5 ml TBA renk reaktifi eklendi. Tüpler 37°C'da 30 dak. inkübe edildi. Numune yerine 2 ml FTS konularak ve diğer reaktifler aynen eklenerek hazırlanan ve her iki inkübasyona da konulan bir köre karşı 443 nm de NK ve N tüplerinin optik dansiteleri tesbit edildi. N ile NK absorbansları arasındaki fark numunenin gerçek optik dansitesini gösterdi.

D- Standart Eğrinin Hazırlanması

Bir seri fruktoz iki seri HMF standardı daha önce anlatıldığı şekilde hazırlandı. Humune yerine 2ml standart alınarak diğer işlemler bunlar için de uygulandı. Ancak HMF standartlarından bir seri, otoklav inkübasyonuna konulmadı. Bu çalışma otoklavda saf HMF in ne oranda azaldığını görmek için yapıldı. Bu üç seri standart için grafik çizildi (Şekil-3).

E- Sonuçların Hesaplanması

Deney şartlarımızda 1 mol fruktoz 1 mol HMF e dönüştüğünde (11) hazırlanan standart eğri, sonuçları $\mu\text{mol HMF/L}$ birimiyle vermektedir. Hemolizat 10 gr Hb/L içerdiğinden bu değerleri 10'a bölmek suretiyle $\mu\text{mol HMF/gr Hb}$ (=HMF indeksi: HMF_i) elde edildi. HbA'nın ne oranda glikozillendiğini bulmak için



Şekil-3: HMF ve Fruktoz Standart Eğrileri
 (HMF₁ : Otoklavda inkübe edilmeden)
 (HMF₂ : Otoklavda inkübe edilerek)

$$\% \text{HbA}_{1c} = \frac{32.000 \times 100}{10^6} \times \text{HMF}_i = 3,2 \times \text{HMF}_i$$

formülü kullanıldı. Bu formülde, 32,000 hemoglobinin alfa-beta dimerinin molekül ağırlığı; 100, % ye çevirme faktörü, 10⁶, mol'ü µmol'e çevirme faktörüdür.

BULGULAR

Hasta ve kontrol grubuna ait AKŞ, Hb, HMF_i ve % GH. sonuçları Tablo-1'de verilmiştir. Diyabetlilerde tesbit-edilen AKŞ ve % GHb sonuçları normal kişilere oranla daha yüksektir. Bu farklar istatistik açıdan çok önemlidir (her iki parametre için de P < 0,001). Hb değerleri ise önemli bir fark göstermedi. HMF_i ile Hb ve AKŞ arasındaki ilişki her iki grup için de araştırıldı. Soruclar Tablo-II de gösteridi. İstatistik açıdan önemli korelasyon diyabetlilerde AKŞ ile HMF_i arasında (r= 0,90; P < 0,001) tesbit edildi. Bu, hemoglobin glikozilasyonunun yüksek kan glukozu konsantrasyonu ile arttığını göstermektedir.

Fruktoz ve HMF standart çalışmaları otoklava konulan saf HMF nin yaşlaştık % 35 oranında parçalandığını gösteriyor. Otoklava konulan HMF ve fruktoz standartları arasındaki fark ise % 12 civarındadır.

TARTIŞMA

Yüksek kan glukozu konsantrasyonlarının diyabetli hastalarda sebep olduğu komplikasyonları araştırmak için proteinlerin non-enzimatik glikolizasyonu üzerine çeşitli çalışmalar (2,15,16) yapılmıştır. Bunların arasında Hb molekülünün glikozillenmesi üzerinde ayrıntılı olarak çalışılmış ve HbA_{1c} çeşitli yönleri ile araştırılmıştır. GHb nin 2 ay veya daha fazla önceki ortalama kan glukozu seviyeleri için bir indeks olduğu (17), kan glukozu seviyesi ile HbA_{1c} arasında (18) ve HbA_{1c} ile glisemi parametreleri arasında (AKŞ, glukozüri, serum trigliseritleri) (19) nemli bir korelasyon bulunduğu tesbit edilmiştir.

Hemoglobinin glikozillenmesine kan glukoz konsantrasyonu, anormal hemoglobinler (HbF, HbS, HbH, HbC) (20), eritrosit ömrü (2), aspirin (22), üremi (23, 24,25) ve gebelik (26,27) etki etmektedir. Ayrıca konu, kullanılan tayin metodu açısından da özellik arz etmektedir. GHb kolon kromatografisi (28,29) izoelektrik odaklama (30,31), agar jel elektroforezi (32) immunoassay (33), afinite kromatografisi (34), kolorimetri (11, 35,36) ve florimetri (37) ile tayin edilmiştir. Bir metodun ucuz, pratik, güvenilir, rutin klinik laboratuvarlarda uygulanabilir ve tayin edilecek maddeye spesifik olması istenir. Ancak bir metodun bütün bu özellikleri taşıması da mümkün değildir.

Hızlı hemoglobinler ilk defa kolon kromatografisi ile bulunmuşlardır. Güvenilir olmasına rağmen uzun zaman almaması, pH ve osmolariteye sıkı bağımlılığı (38), sıcaklığın (39), anormal hemoglobinlerin (40) ve yüksek dozda aspirin kullanımının sonuçlara etki etmesi bu metodun sakıncaları arasında sayılabilir. Kolon kromatografisi ile izoelektrik odaklama arasında HbA_{1c} açısından önemli bir korelasyon bulunmuştur (41). İzoelektrik odaklama HbA_{1c} yi HbF den ayırdedebildiği halde aspirin sebebiyle asetillenmiş HbA_{1c}'i HbA_{1c} diye ölçüp yanlış pozitif sonuçlara neden olmaktadır.

Çalışmamızda uyguladığımız kolorimetrik metoda daha sıklıkla başvurulmaktadır. Bu metod, hemoglobin molekülünün fiziksel özelliklerinin değişmesine değil, bu molekülün taşıdığı katoamin yapısındaki heksozların tayin edilmesine dayanmaktadır (35). Bu, kolorimetrik metodun ketoamin başına spesifik olması anlamına gelir. Sonuçların tekrarlanabilirliği açısından eleştirilmişse de (15,42, 43), hidroliz ve renklendirme basamakları iyi bir şekilde optimize edilirse bu sakıncası ortadan kalkar (36). Kaldı ki kolorimetrik metod hem pratik hem de ucuzdur. Diyabetli ve normal şahıslar için bulduğumuz % HbA_{1c} değerleri literatürle (44) uygunluk göstermektedir.

Son zamanlarda bu metodun rutin laboratuvarlarda uygulanabilmesi için çalışmalar yapılmıştır. Özellikle Parker ve arkadalarının (11) daha önceki araştırmacıların kullandıkları 3-16 saatlik hidroliz inkübasyon zamanını, 124°C ve 124 kPa'da otoklavda 1 saate indirmeleri deneye son derece pratiklik kazandırmıştır. Ancak bu şekilde metodu standardize etmede iki nokta önemlidir (45): Hidrolizin tam ol-

masını sağlamak ve numunedeki Hb konsantrasyonunun dikkatlice tayin edilmesi. Bunlar gerçekleştirildiği takdirde TBA kolorimetrik metodun rutin laboratuvarlar da uygulanabileceği (13) kabul edilmektedir.

Kolorimetrik metodun kolon kromatografik metoda üstünlüğü şu şekilde sıralanabilir: (a) Hemolizat 5°C'da 80 gün saklandığı halde kolorimetrik metod doğru sonuç verirken kromatografik yöntem aynı şartlarda 10 gün süreyle saklanmış örneklerde doğru sonuçlar vermektedir (46). (b) Kolorimetrik yöntem normal hemoglobinlerden etkilenmez (45); başka bir deyişle HbA_{1c} ye özgüdür. (c) Bu metod diğer glikozillenmiş proteinlerin tayini için de (47,48,49) kullanabilmektedir (d) Hemoglobinin yapısındaki kararlı katoamin grupları TBA kolorimetrik yöntemle reaksiyon verdiği halde kararsız Schiff bazları aynı reaksiyonu vermezler (50).

Hemoglobinin glikozillenmesinin non-enzimatik reaksiyonuna ait hız, iki reaktifin konsantrasyonuna bağlıdır: Glukoz ve Hb. Hemoglobin konsantrasyonunun hemen hemen sabit kaldığı kabul edilirse, glikozilasyon hızının uzun süre yüksek seviyede kalan glukoz tarafından belirlendiği söylenebilir. Geçici ve ani glukoz seviyesi yükselmeleri ise HbA_{1c} sentez hızına etki etmez. Ditzel ve Kjaergaard (17), diyabetli bir hastanın kan glukozu kontrole alındıktan sonra GHb düzeylerinde yavaş yavaş düşme olduğunu göstermişlerdir.

Glikozillenmiş hemoglobinin klinik önemi kendini şimdilik diyabette göstermektedir. Bu hastalığın tedavisi, kan glukozunun kontrol altına alınmasına ve uzun süre sonra ortaya çıkacak mikro ve makrovaskular komplikasyonların önlenmesine yöneliktir. İyi bir glisemik kontrolün, mikrovaskular komplikasyonları önleyebileceği fikri geçerliliğini korumaktadır(51). Geniş prospektif ve retrospektif çalışmalar (52, 53) iyi bir glisemik kontrolün diyabetik mikrovaskular komplikasyonlarını önleyeceğini veya bunları iyileştirmede yararlı olabileceğini göstermiştir. Öteden beri AKŞ ile glikozüri kan şekerinin regülasyonunda aracı olarak kullanılmaktadır. Ancak idrar şekeri ile kan şekerinin de zaman zaman uyumsuzluk gösterdiği tesbit edilmiştir (54). Bu nedenle son zamanlarda diyabetlilerde kan glukozunun kontrolü için HbA_{1c} düzeylerinin kullanılması üzerinde durulmaktadır.

Diyabetlilerde normal kişilere oranla daha fazla hemoglobin glikozillenmesi eritrosit karbonhidrat metabolizmasındaki bir bozuklukla ilgili değildir. Çünkü normal bir kişiden alınan eritrositler diyabetli bir hastaya verildiğinde hemoglobin glikozillenmesi normalin 2,7 katı kadar artmıştır. Diğer taraftan, normal bir kişiye verilen diyabetli eritrositlerinde diyabetlilerdekine oranla daha az bir glikozilasyon tesbit edilmiştir (55). Buna dayanarak, GHb oluşumunda en önemli faktörün kan glukozu konsantrasyonu olduğunu söyleyebiliriz. Cerami (56), HbA_{1c} nin AKŞ ve üriner glukozdan daha önemli bir glisemik kontrol vasıtası olabileceğini öne sürmüştür. Aynı araştırmacıya göre, protein glikozilasyonu diyabetin nöropati, retinopati ve nefropati gibi komplikasyonlarını araştırmada yardımcı olabilir.

HbA_{1c}, ilk keşfedildiği yıllarda bunun diyabet için genetik bir işaretçi olabileceği zannedildi. Daha sonraki çalışmalar (57,58), durumun böyle olmadığını gösterdi. İdiopatik diyabetes mellituslu hastalarla Cushing sendromuna bağlı olarak çıkan diyabetlilerde GHb seviyelerinin önemli bir fark göstermediği tesbit edilmiştir (57). Trivelli ve arkadaşları (29), ketoasidozlu veya enfeksiyonlu diyabetlilerde HbA düzeyleri için en yüksek değer elde etmişlerdir. Diyabetin tedavi süresi, böbrek, sinir, göz, periferel vaskular veya kardiyovaskular hastalıklar ve HbA_{1c} arasında yine aynı araştırmacılar bir ilgi tesbit edememişlerdir. Başka bir grup araştırmacı tarafından ise (29,59), şiddetli enfeksiyonu olan veya ketoasidozlu diyabetlilerde GHb yüksek bulunmuştur. Bunun daha önce metabolik kontrolün bozulmasından ileri gelebileceği (13) öne sürülmüştür. Ancak anormal protein glikozilasyonun diyabetin komplikasyonlarının ortaya çıkmasına nasıl sebep olduğu açıklık kazanmamış ve araştırmaya muhtaç bir konudur.

Glikozilenmiş hemoglobin tayini iyi bir metabolik kontrol indeksi olabilir (60). Ancak glikozilasyon hızına daha önce bahsedilen faktörlerin etki etmesi problem olarak karşımızda durmaktadır. Diyabetlilerin günlük takibi için ise AKŞ tayinlerinin yapılması gereklidir.

Yaptığımız standart çalışmaları saf HMF'ın otoklavda inkübe edilmesi halinde yaklaşık % 35'inin paraçalandığını ve çalışılacak standardın (ister HMF olsun ister fruktoz olsun) mutlaka deney şartlarında tutulmasını (otoklavda inkübasyonu) gerektiğini göstermektedir.

Tablo-1: Hasta ve kontrol grubunda AKŞ, Hb, HMF_i, % HbA_{1c} değerleri ve bunların istatistik anlamı.

	AKŞ	Hb	HMF _i	% HbA _{1c}
Diyabetli (n=10)	312±59 (210—396)	15,7±1,4 (13,6—17)	6,2±1,8 (3,6—8,5)	19,9±6 (11,5—27)
Kontrol (n=10)	83±15 (63—102)	15,5±1,5 (13,5—16)	1,4±0,6 (0,8—2,3)	4,9±1,9 (2,5—7,3)
	P<.3,901	P<0,02	P<0,001	P<0,001

Tablo-II Hasta ve Kontrol Grubunda korelasyon hesabı sonuçları

		r	t	P
Diyabetli	Hb-HMF _i	0.50	1.66	>0.05
	AKŞ-HMF _i	0.90	6.00	<0.001
Kontrol	Hb-HMF _i	0.06	0.17	>0.05
	AKŞ-HMF _i	-0.30	0.99	>0.05

DETERMINATION OF HEMOGLOBIN GLYCOLYSATION BY COLORIMETRIC METHOD

SUMMARY

That the hemoglobin binds glucose is known as glycosylation. A labile Schiff base is formed as a result of nonenzymatic bimolecular condensation reaction between glucose and amino group of the first amino acid valine in beta-chain of hemoglobin molecule. Then, the Schiff base is arranged into stable ketoamine form by Amadori rearrangement. This constitutes the HbA_{1c} fraction in column chromatography. In present study, by using a modified colorimetric method, HbA_{1c} has been estimated in erythrocytes from 10 healthy and 10 diabetic subjects HbA_{1c} % in (19±6) and control group (4,9±1,9) differers in statistics (P < 0,001). The correlation of fasting blood glucose levels to HbA_{1c} has been found to be significant (r= 0,90; P < 0.001). This suggests that the high rate of glycosylation in diabetics is related to high blood glucose concentrations colosely.

KAYNAKLAR

- 1- Spicer, K. M., Allen, R. C., Buse, M.G. (1978): Asimplified assay of hemoglobin A_{1c} in diabetic patients by use of isoelectric focusing and quantitative microdensitometry. *Diabetes* 27: 384-388.
- 2- Bunn, H. F. (1981): Nonenzymatic glycosylation of protein: relevance to diabetes. *Am. J. Med.* 70: 325-330.
- 3- Bayer, H. *Organic Chemistry* (tranlated by Knoot. E.B.) (Greiswald-1963): s. 288-289.
- 4- Koenig, R. J., Blobstein S.H., Cerami, A. (1977): A structure of carbohydrate of hemoglobin A_{1c}. *J. Biol. Chem.* 252: 2992-2997.
- 5- Mortensen, H. B., Volund, A., and Christopheksen, C. (1984): Glucosylation of human haemoglobin A. Dynamic variation in HbA_{1c} described by a biokinetic model. *Clinica Chemica Acta* 136: 75-81.
- 6- McDonald M. J., Shapiro, R., Bleichman, M., Solway, J., Bunn, H.F. (1978): Glycosylated minar components of human adult hemoglobih: purification, identification and partial structural analysis. *J. Biol. Chem.* 243: 2327-2332.
- 7- Shapire, R., McManus, M. J., Zalut, C. and Bunn, H.F. (1980): Sites of nonenzymatic glycosylation o human hemoglobin A. *J. Chem.* 255 (7): 3120-3127.
- 8- Stevens, V. J., Vlassara, H., Abati, A., Verami, J. (1977): Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 252: 2998-3002.
- 9- Buun, H. F., Haney, D.N., Kamin, S., Gabbay, K.H., Galop, P.M. (1976): Biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}: slow glycosylation of hemoglobin in vivo. *J. Clin. Invest.* 57: 1652-1659.

- 10- Huisman, T.H.J., Meyering C.A. (1960): Studies on the heterogeneity of hemoglobin. 1. The heterogeneity of different human hemoglobin types in carboxymethylcellulose and in amberlite IRC-50 chromatography: qualitative aspects. *Clin. Chim. Acta.* 50: 103-122.
- 11- Parker, K.M., England, J.D., DaCosta, J., Heas, R., Goldstein, D.E. Improved colorimetric assay for glycosylated hemoglobin. *Clin. Chem.* (1981). 27: 669-672.
- 12- Smith, R. J., Koenig, R. J., Binnerts, A, and et al. (1982): Regulation of Hemoglobin A_{1c} formation in human erythrocytes in vivo. *J. Clin. Invest.* 69: 1164-1168.
- 13- Mayer, T.K., and Freedman, Z.R. (1983): Protein glycosylation in diabetes mellitus: a review of laboratory measurements and of their clinical utility. *Clin. Chim. Acta.* 127: 147-184.
- 14- Kitzis, A., Baudis, M., Auge, A.M. Gaochon, A.M. Dastugue, B., and Wejeman, H. (1982): Fast fluctuations of glycosylated hemoglobin. II. Hemoglobin A_{1c} determination and oral tolerance test. *Clin. Chim. Acta.* 121: 133-137.
- 15- Bunn, H. F., Gabbay, K. H., Gallop, H.M.: The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science.* 200: 21-27.
- 16- McDonald, J. M. Davis, J. E. (1979): Glycosylated hemoglobins and diabetes mellitus. *Hum. Pathol.* 30: 279 -291.
- 17- Ditzel, J., Tjaergaard, J. (1978): Hemoglobin A_{1c} concentrations after initial insulin treatment for newly discovered diabetes. *Br. Med. J. J:* 741-742.
- 18- Gonen, B., Rubenstein, A.H., Rochman, H., Tanega, S.P., Horwitz, D.L. (1977): Hemoglobin A₁: an indication of the metabolic control of diabetic patients. *Lancet.* 2: 734-736.
- 19- Durn, R.A., Cole, J. S., Sceldner, R. E., et al. (1979): Temporal relationship of glycosylated hemoglobin concentrations to glucose control in diabetes. *diabetologia,* 17: 213-220.
- 20- Dix, D., Cohen, P., Kinsley, S., Lea, M.J., Senkbeil, J., Sexton, K. Interference by lactescence in glycohemoglobin analysis. *Clin. Chem.* (1979) 25: 494-495.
- 21- Panzer, S., Kronik, G., Lancner, K., Bettelheim, P., Neumann, E., Dudezak, R. (1982): Glycosylated hemoglobin (GHb): an index of red cell survival. *Blood.* 59: 1348-1350.
- 22- Biridges, K. R., Schmidt, G. J., Jenson, M., Cerami, A., Bunn, H. F. (1975): The acetylation of hemoglobin by aspirin in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 56: 201-207.

- 23- Caparie, A. F., Miedema, K. Glycosylated hemoglobin in diabetes and renal failure (1977): *Lancet*. 2: 758-759.
- 24- Graf, H., Stummvoll, H. K., Schnernthauer, G., Muller, M.M. (1980): Glycosylated hemoglobin in renal failure. *Diabetologia*, 19: 555-556.
- 25- Oimomi, M., Ishikama, K., Kawasaki, T., Kubota, S., Yoshimora, Y., Baba, S. (1981): *Diabetologia*, 21: 163.
- 26- Widness, J. A., Schwartz, K.H.C., Mahn, C. B., Oh, W., Schwartz, R. (1980): Glycohemoglobin in diabetic pregnancy: a sequential study. *Am. J. Obstet Gynecol* 136: 1024-1029.
- 27- Lind, T., Cheyne, G. A. (1979): Effect of normal pregnancy upon the glycosylated haemoglobins. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 86: 210-213.
- 28- Allen, D. W., Schroeder, W. A., Balog, J. (1958): Observations on the chromatography heterogeneity of normal adult and fetal hemoglobin: a study of the effects of crystallization and chromatography in the heterogeneity and isoleucine content. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 1628-1632.
- 29- Trivelli, L. A., Rannen, H. M., Lai, H. T. (1971): Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.* 284: 353-357.
- 30- Drysdale, J. W., Righeti, P. G., Bunn, H. F. The separation of human and animal hemoglobins by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. *Biochim Biophys. Acta.* 1971, 229: 49-50.
- 31- Krishnamoorthy, R., Wajcman, H., Lbie, D. Isoelectric focusing: a method of multiple applications for hemoglobin studies. *Clin. Acta* 1976; 69: 203-209.
- 32- Allen, R. C., Stastny, M., Halalett, D., Simmons, M A.A. Comparison of isoelectric focusing and electrochromatography for the separation and quantification of hemoglobin A_{1c}. (1979): In: Radola, J.B. ed. *Electrophoresis*, New York NY: de Gruyter, 663-668.
- 33- Javid, J., Pettis, P. K., Koenig, R. J., Cerami, A. (1978): Immunological characterization and quantification of Hb A_{1c}. *Br. J. Haematol.* 38: 329-337.
- 34- Mallia, A. K., Perkmanson, G.T. Krohn, R.I., Fujjimota, E.K., Smith, P. K. (1981): Preparation and use of a boronic acid affinity support for separation and quantitation of glycosylated hemoglobins. *Anal. Lett.* 14: 649-661.
- 35- Flückiger, R., Winterhalter, K.H. (1976): In vitro synthesis of hemoglobin A_{1c}. *FEBS Lett.* 71: 356-360.
- 36- Subramanian, C.V. Radhakrishnamurthy, B., Berenson, G.S. (1980): Photometric determination of glycosylated hemoglobin in diabetes mellitus. *Clin. Chem.* 26: 1638-1687.

- 37- Gallp, P. M., Flückiger, R., Hannekon, A., Mininsohn, M.M. Gabbay, K.H. (1981): Chemical quantitation of hemoglobin glycosylation: fluorimetric detection of formaldehyde released upon periodate oxidation of glycoglobin. *Anal. Biochem.* 117: 427-432.
- 38- Jongeneel, J., Van Wissen, M. (1979): cptiziming measurement of glycosylated hemoglobins. *Clin. Chem.* 25: 642.
- 39- Rosenthal, M.A. (1979): The effect of temperature on the fast hemoglobin test system. *Hemoglobin.* 3: 215-217.
- 40- Kaplan, L. A., Cline, D., Gartside, P., Burstein, S., Sperling, M., Stein, E. A. (1982): Hemoglobin A₁ in hemolysates from healthy and insulin-dependent diabetic children. as determined with a temperature controlled mini-column assay. *Clin. Chem.* 28: 13-18.
- 41- Nathan, D. M., Francis, T.B., and Palmer, J. L. (1983): Effect of aspirin on determinations of glycoylated hemoglobin. *Clin. Chem.* 29/3: 466-469.
- 42- Garel, M. C., Blouquait, Y., Lolko, F. Rosa, J. (1979): HbA_{1c}: a review on its strcture, biosynthesis, clinical significance, and methods of assay. *Biomedicine.* 30: 234-240.
- 43- Abraham, E. C. Huff, T.A., Cope, N. D., Wilson, J. B., Bransome, E. D., Huisman, T.H.J. (1978): Determination of the glycosylated hemoglobins (HbA₁) with a new microcolumn procedure: sutiability of the technique for assessing the Clinical management of diabetes mellitus. *Diabetez.* 37: 931-937.
- 44- Standefer, j. ., and Eaton, R. P. (1983): Evaluation of a colorimetric method for detrmination of glycoylated hemoglobin. *Clir. Chem.* 29/1: 135-140.
- 45- Pecoraro, R. E., Grag, R. J., Halter, J. B., Beiter, H., Pore, D. Jr. (1979): Comparison of a colorimetric assay for glycosylated hemoglobin with ion-exchange chromatography. *Diabetes.* 28: 1120-1125.
- 46- Postmes, T.L.J., Halders, S., Herpers, H., Ses, J. P., Coenegracht, J. M. (1981): Colorimetry vs. columr chromatography in HbA₁ assay. *Clin. Chem.* 27: 635-636.
- 47- Stern S.S., Rücker, A., and Endres, W. (1984): Glycated haemoglobin and glycated albumin: Evaluation of different methods in diabetic control. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22: 47-51.
- 48- Paiser, R.B., Clamp, J.R., Kent, J. C., Light, N. D., Hopton, M., Hartog, M. (1984): Glycosylation of hair: Possible measure of chronic hyperglycaemia. *Brit. Med. J.* 288: 669-671.
- 49- Menez, J. F., Maskkkar, A., Lucas, D., Carragon, T., Floch, H.H.' Bardon, L.G. (1981): Glycosylated hemoglobins and serum protein: Semi-automated estimation. *Clin. Chem.* 27: 1947-1948.

- 50- DaCosta, J., Hess, R., England, J., Peth, S. (1980): Measurement of glycosylated hemoglobin: Comparison of colorimetric and ion-exchange chromatographic methods. *Diabetes*. 29: suppl 2. Abstract No. 273.
- 51- Cahill, G. F., Etzwiller, D.D., Freinkel, N. (1976): Control and diabetes. *N. Engl. J. Med.* 294: 1004-1005.
- 52- Tchobroutsky, G. (1978): Relation of diabetic control to development of microvascular complications. *Diabetologia*. 15: 143-152.
- 53- Eschwege, E., Job, D., Guyot-Argeton, C., Aubry, J.P. Tchobroutsky, G. (1979): Delayed progression of diabetic retinopathy by divided insulin administration: a further follow-up. *Diabetologia*. 16 : 13-15.
- 54- Malone, J. I., Rosebloom, A. L. X Grgic, Weber, T.F. (1976): The role of urine sugar in diabetic management. *Am. J. Dis. Child.* 130: 1324-1427.
- 55- Harper, H. A. Rodwell, V.W., Mayes, P. A. (1979): Review of physiological Chemistry. San Fran Cisco, s. 204-205.
- 46- Cerami, A., Koenig, R., Peterson, C.M. (1978): Annotation: Hemoglobin A_{1c} and diabetes mellitus *Br. J. Haemathol.* 38: 1-4.
- 47- Bperstein, M. D., FASTER, D. M. Knowles, H. C., Levine, R., Madison, L.L., Roth, J. (1977): Control of blood glucose and diabetic vascular diseases. *N. Engl. J. Med.* 296: 1060-1063.
- 58- Tattersall, R., Gale, E. (1981): Patient self-monitoring of blood glucose and refinements of conventional insulin treatment. *Am. J. Med.* 70: 177-182.
- 59- Paulson, E., Koury, M. (1976): Hemoglobin A_{1c} levels in insulin-dependent and independent diabetes mellitus. *Diabetes*. 25: Suppl. 2. 890-896.
- 60- Golstein, D.L. (1984): Is glycosylated hemoglobin clinically useful? *N. Engl. J. Med.* 9: 384-385.