

HEMOGLOBİN GLİKOZİLASYONU, GLİKOZİLLENMİŞ HEMOGLOBİN (GHb, HbA_{1C}) VE KLİNİK ÖNEMİ

Nuri BAKAN (x)
Dr. M. Münip YEĞİN (xx)

ÖZET:

Bu derlemede hemoglobin glikozilasyonu, glikozillenmiş hemolobin ve klinik önemi, bu konuda yapılmış araştırmaların ışığında tartışılmıştır.

A- Hızlı Hemoglobinlerin Keşfi

1955 yıunda Kunkel ve Wallenius (1) nişasta jel elektroforezine hemoglobin örnekleri tatbik ettiler. Hem yavaş hareket eden (HbA₂) hem de hızlı hareket eden fraksiyonların varlığını gösterdiler. Allen ve arkadaşları (2) 1958 de hemoglobin A (HbA) dan, heterojen hızlı bir fraksiyon elde edecek şekilde, katyon değış-tirici kolonu kullandılar. 256 saat gibi uzun bir süreyi gerektiren modifiye şartlar altında, aynı kolon hızlı fraksiyonu üç komponente ayırabilmektedir. Bunlara HbA_{1a1}, HbA_{1a2} ve HbA_{1C} adları verilmiştir. 1961 yılında Schneck ve Schroeder, bu üç hızlı fraksiyonun, hızlı elektroforetik fraksiyonda yer aldığını (3), 1962 de Huisman ve Dozy ise karboksimetil seluloz kolonlarının bu "hızlı" hemoglobini üç fraksiyona ayırabildiğini (4) gösterdiler

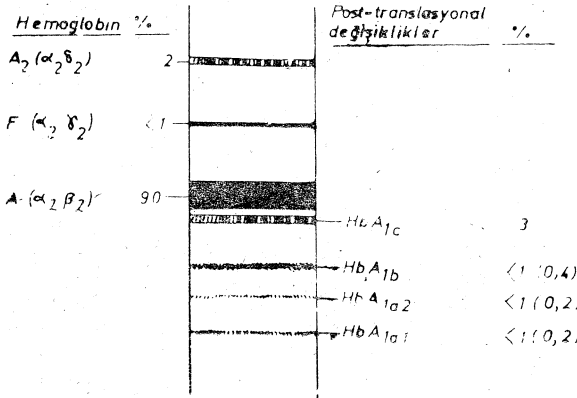
Bu hızlı hemoglobinlerin herhangi bir öneme sahip olup olmadığı 1968 e kadar anlaşılamamıştır. 1968 de Rahbar (5), belli başlı diyabetik hastalardan alınan kan-lardan hazırlanan hemolizatta nadir bir hemoglobin varlığını gösterdi. Bu hemog-lobin, sitrat agar jeli üzerinde hemoglobin F dekine benzer bir elezroforetik mo-biliteye sahiptir. Ancak bu, Hemoglobir F'in aksine alkali tarafından denatüre edil-miştir. Ranbar ve arkadaşları (6), yaptıkları daha sonraki çalışmalarla, nadir he-moglobinlerin, özellikle glikozillenmiş hemoglobin (HbA_{1C})'in özelliklerini taşı-dığı ve diyabetlilerde normallere oranla iki katlık bir artış meydana geldiğini gös-terdiler.

(x) Arş.Gör.Uz. A.Ü. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı
(xx) Prof.Dr. A.Ü. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı.

B- "Hızlı Hemoglobinlerin Kimyasal Tabiatı

Hızlı hemoglobinler, katyon değiştirici kromatografisi yardımıyla uygun bir şekilde ayrılabilir. Uygun şartlar seçildiğizaman, bunlar 4 fraksiyon halinde ayrılacaktır. Ayrılan bu fraksiyonlara, HbA_{1a1} , HbA_{1a2} , HbA_{1b} ve HbA_{1c} adları verilmiştir (7). Bunlar, diyabetik olmayan şahıslarda total hemoglobinin sırasıyla yaklaşık % 0,2,0,2,0,4 ve 3 ünü meydana getirir.-Bütün bu komponentlerin, HbA nın noenzimatik translasyon sonrası modifikasyonlardan kaynaklandığı zannedilmektedir. Beta zincirinin terminal amino grubu, glukoz ile "aldimin" ürünü oluşturduğu zaman, HbA_{1c} meydana gelmektedir. HbA_{1a1} ve HbA_{1a2} de ise beta terminal aminleri ile sırasıyla fruktoz difosfat ve glukoz 6 fosfat arasındaki spesifik etkileşmeden meydana geldiği zannedilmektedir. Hemoglobin A_{1b} ise HbA (veya $HbAo$) nın bir deaminasyon ürünü olabilir.

Jel elektroodaklama metoduna göre normal eritrositler içerisindeki hemoglobin bileşenleri şekil 1- de gösterilmiştir (7). Glikozilasyon, hemoglobinin alfa veya beta zincirindeki bazı amino asitler (valin lizin gibi) in amino grupları ile olabilir. Ancak pH 6 civarında kromatografik bir fraksiyon halinde tesbit edilebilecek uygun bir pK değerine sahip olan HbA_{1c} dir.

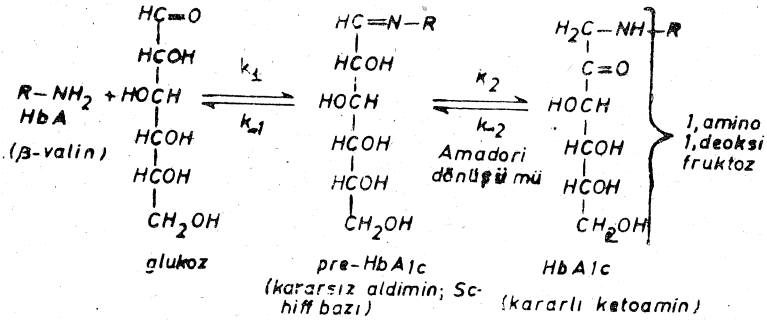


Şekil-1: Normal eritrositlerdeki hemoglobin bileşenleri (jel elektroodaklama metoduna göre)

C- Hemoglobin Glikozilasyonu Ve Glikozillenmiş Hemoglobin

Hemoglobinin glikoz bağlanmış şekline glikozillenmiş hemoglobin veya HbA_{1c} denir. HbA_{1c} de beta zincirinin NH_2 -terminal valin amino asidine bir heksozun (veya bir heksoz fosfatın) bağlı olduğu (9,10,11) tesbit edilmiştir. Boockin ve Gallop (10), bağlanan grupların heksozlardan ibaret olduğunu ve hemoglobin tetrameri başına iki molekül bağlandığını, yani her alfa-beta dimeri başına bir heksozun veya heksoz fosfatın bağlı olduğunu gösterdiler.

Aynı çalışmalarla, glikozillenmenin ketoamin bağıyla kararlı yapıyı kazandığı gösterilmiştir. Reaksiyonda glikoz ile HbA₁'in kararsız bir Schiff bazı meydana gelir (aldimin). Bu da "Amadori Dönüşümü" (12) ile kararlı bir yapı olan HbA_{1c} (ketoamin) ye dönüşümsüz olarak dönüşür. Toplu reaksiyon ve denge sabitleri Şekil-2 de gösterilmiştir (13,14,15). Diğer taraftan biyokinetik bir model kullanılarak HbA_{1c} oluşum reaksiyon hız sabitine bir yaklaşım sağlanmıştır (15,16). Buna dayanarak, şekil 2 deki reaksiyon dizisinde, birinci basamağın ikinci basamaktan 60 kat daha hızlı olduğu bulunmuştur (8).



Şekil-2: Hemoglobinin glikozillenme reaksiyonları.

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

Hemoglobin A₁ in şerker fosfatları ile olan reaksiyonları (13,17) glukoz ile olan reaksiyonlarına rağmen daha hızlıdır. Ancak bunlar, dönüşümlüdürler ve HbA₁ HbA_{1a2} ve HbA_{1b} yapısına girerler (13). Diğer taraftan, diyabetli hasta eritrositlerinde bu üç hemoglobin türünün hiçbir zaman yükselmediği tesbit edilmiştir (18).

HbA_{1c} nır eritrositlerin 120-130 günlük ömrü boyunca sentezlendiği ⁵⁹Fe transferrin verilen bir kişiden alınan kan örneklerinin analizleriyle anlaşılmıştır (13). Seri halde belli aralıklarla 120 gün süreyle alınan numunelerde devamlı olarak hemoglobin A_{1c} in artması, glikozillenme reaksiyonunun eritrositlerin ömrü boyunca yavaş, yavaş devamlı, non-enzimatik ve dönüşümsüz bir reaksiyon olduğu fikrine götürmüştür. Bunu destekleyen bir bulgu da genç eritrositlerde HbA_{1c} nin düşük bulunması ve hemolitik anemilerde düşük konsantrasyonlarda tesbit edilmiş (13) olmasıdır.

HbA_{1c} nin eritrosit ömrüne bağlı olduğu, bu hücrelerin hayat sürelerinin insanlardakinlerden daha kısa olduğu hayvanlarda, glikozillenmiş hemoglobin (GHb) yüzdesinin de düşük olmasından anlaşılmıştır (13). Bununla beraber, glikozillenmiş hemoglobin seviyelerinin yorumlanmasında eritrosit dayanklılığının (hemoliz derecesinin) göz önünde bulundurulması gerekir (13).

D- Hemoglobin Glikozilasyonuna Etki Eden Faktörler

Hb glikozillenmesine etke eden faktörler arasında kan glukoz konsantrasyonu, anormal nemoglobinler, aspirin, hemoliz, üremi ve gebelik sayılabilir:

a- Glukoz: Hemoglobin glikozilasyonu reaksiyonlarına, glukoz konsantrasyonunun yüksek olmasının büyük etkisi vardır. Geçici ve ani glukoz seviyesi yükselmeleri, kararsız aldimin yapısındaki GHb'i yükseltirken, uzun süreli yüksek glukoz konsantrasyonu kararlı ketoamin formunu (HbA_{1C}) yükseltmektedir (13,19).

b- Anormal Hemoglobinler: Diğer hemoglobinler, glikozillenmiş hemoglobin tayinin doğru olarak yapılmasında bazı yanlışlıklara sebep olabilir. Mesela birçok hematolojik hastalıklarda ve gebelikte yükselen HbF, bütün kromatografik metodlarda, hızlı hemoglobinlerle birlikte yürür. HbH, HbS ve HbC için de aynı şey söylenebilir. HbH glikolizasyon da yüksek değerler gösterirken HbS ve HbC düşük değerlerin tesbit edilmesine yol açar. Glikozillenmiş hemoglobin tayini, yıkanmış eritrosit süspansiyonundan hemolizat hazırlanarak yapılmaz ve numune olarak total kan kullanılırsa, sarılıklı kan örnekleri yanlış neticelere sebep olur Çünkü, bilirubin hızlı hemoglobinlerle birlikte ortak bir fraksiyon oluşturur (13).

c- Hemoliz: Eritrosit ömrünün kısa olduğu hastalıklarda düşük hemoglobin glikolizasyonu gözlenir. Eritrosit transfüzyonu, bu transfüzyonda verilen hemoglobinin nisbetinde glikozillenmeyi artırır. Tersine, splenektomi'yi müteakiben artan eritrosit ömrü ile birlikte HbA₁ konsantrasyonunda yükselme görülür (13,19).

d- Aspirin: Aspirin, hemoglobini asetiller (20). Asetillenmiş hemoglobin, hızlı Hb lerle aynı elektroforetik mobiliteye sahiptir. Elektroforetik metotta ortaya çıkan bu yanlışlık, hastaların yüksek dozda aspirin almaları engellenerek önenebilir (13,21).

e- Üremi: Bazı araştırmacılar (13,22); üremide GHb ve HbA₁ seviyelerini yüksek tesbit etmişlerdir. Ancak yüksekliğin hemoglobin glikozillenmesinden ileri gelmediği anlaşılmıştır. Bu yükseklik Hb karbamilasyonundan ileri gelir. Çünkü bu hastalar da üre spontan olarak amonyak ve siyanata disosiyeye olur (13).

f- Gebelik: Gestasyonun 20. haftasından sonra HbA_{1C} nin normale göre azaldığı (23) ve gebelik sonuna kadar devam ettiği (13) tesbit edilmiştir. Normal gebelikteki glikozillenmiş hemoglobin miktarındaki bu azalma normal glukoz üretiminin azaldığına işaret edebilir. zaten gebelikte glukoz üretimi azalır ve ikinci trimesterde eritropoez artar. Genç eritrositlerde glikozillenmiş hemoglobinin düşük olması da bunu destekler (24).

E- Glikozillenmiş Hemoglobin ve Klinik Önemi

Uzun süre yüksek kan glukozu seviyelerine maruz kalan dokular üzerinde glikozillenme reaksiyonlarının çok önemli fizyolojik etkileri olmaktadır (13). Bu sebep-

ten vücutta çok çeşitli proteinler glikozillenmektedir. Bazal membran proteinleri (24), kollagen (27,27). hücre membranındaki proteinler (13), albumin (13,28) ve dolaşımdaki diğer proteinler. Bu proteinlerin glikozillenmesi ile diyabetin mikro ve makrovasküler komplikasyonları arasında bir ilişki olduğu kabul edilmektedir. Ancak tam anlaşılamamıştır ve araştırılmaya açık bir konudur (13).

Hemoglobin glikozillenmesinin non-enzimatik reaksiyonlarına ait hız iki reaktifin konsantrasyonuna bağlıdır; glikoz ve hemoglobin. Hemoglobin konsantrasyonunun hemen hemen sabit kaldığı kabul edilirse, HbA_{1C} oluşum hızının uzun süre değişen glukoz konsantrasyonu tarafından belirlendiği söylenebilir. Geçici ve ani glukoz seviyesi yükselmeleri ise glikozillenmiş hemoglobin seviyelerine hemen hemen hiç etki etmez. Ditzel ve Kjaerdgaard (29) diyabetli bir hastanın kan glukozu kontrol altına alındıktan haftalar ve hatta aylar sonra HbA_{1C} seviyelerinin yavaş yavaş düştüğünü gösterdiler. Kan glukoz seviyeleri ile HbA_{1C} arasında (30) ve glisemi parametreleri (AKŞ, glikozüri, serum trigliseridleri) ile HbA_{1C} arasında (13) önemli korelasyon tesbit edilmiştir. Bu, HbA_{1C} in yüksek kan glukozu konsantrasyonlarına cevap verdiğini göstermektedir. Svendsen ve arkadaşları (31) diyabetli ve normal şahıslardan aldıkları kanı 7 saat süreyle değişik glukoz konsantrasyonlarında inkübe ederek, artan glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak HbA_{1C} sentezinin arttığını gösterdiler.

Bazı araştırmacılar (32,33) kan glukozunun yükselmesinden hemen sonra HbA_{1C} seviyelerinde de yükselme kaydederek ve bunun kararsız Schiff bazından ileri gelmemiş olduğunu ve kararlı ketoamin grubundan dolayı olamayacağını gösterdiler.

Hemoglobin A_{1C} , normal şahıslarda, normal hemoglobnin % 5 ini diyabetlilerde ise % 15 ini oluşturmaktadır (18).

Hemoglobin A_{1C} nin, HbA ile aynı amino asit sırasına sahip olduğu Helmquit ve Schroeder tarafından gösterilmiştir. Bunn ve arkadaşları ise HbA_{1C} nin glukozun 1-amino-1-dezoksi-fruktoz olduğunu belirtmişlerdir (13).

Diyabetik annelerden doğacak çocukların ağırlığı ile glikozillenmiş hemoglobin arasında müsbet bir korelasyon bulunmuştur (34). Diyabetlilerde glikozillenmiş hemoglobin sentezi normal kişilerdekinden 2.7 kat daha hızlıdır (35). Glikozillenmiş hemoglobinlerden sadece HbA_{1C} , diyabetlilerde yükselir Diğer fraksiyonlar aynı kalır. Başka bir ifadeyle HbA_{1C} gliseminin bir ölçüsü olabilir (36).

Glikozillenmiş hemoglobinin klinik önemi kendini şimdilik diyabette göstermektedir. Diyabetin tedavisi, kan glukozunun kontrol altına alınmasına ve uzun süre ortaya çıkacak mikro ve makrovasküler komplikasyonlarının önlenmesine yöneliktir. İyi bir glisemik kontrolün, bu komplikasyonları önleyeceği fikri geçerliliğini halen daha korumaktadır (13).

Geniş prospektif ve retrospektif çalışmalar (13,29) iyi bir glisemik kontrolün, diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarını iyileştirmede yararlı olduğunu göstermiştir. İyi bir kan glukozu kontrolü esastır. Bu, AKŞ, idrarda kalitatif glukoz tayini ve 24 saatlik idrarda kantitatif glukoz tesbiti ile yapılmaktadır. Kalitatif idrar glukozu ölçümü, günlük glisemik kontrol için iyi bir vasıta olmasına rağmen, aynı anda alınan glukozu seviyeleri ile uygunluk göstermeyebilir (13). Artık son zamanlarda, diyabetlilerde kan glukozunun kontrolü için HbA_{1C} ölçümünün kullanılması üzerinde durulmaktadır (13,27).

Diyabetlilerde normal kişilere oranla daha fazla Hb glikozillenmesi, eritrosit karbonhidrat metabolizmasındaki bozukluk ile ilgili değildir. Çünkü normal bir kişiden alınan eritrositler diyabetli bir hastaya verildiğinde hemoglobin glikozillenmesi 2.7 kat artmıştır. Diğer taraftan, normal kişiye verilen diyabetli eritrositlerinde diyabetlilerininkine oranla daha az bir glikozilasyon tesbit edilmiştir (35,38). Buna dayanarak, GHb oluşumunda en önemli faktörün kan glukozu konsantrasyonunun olduğunu söyleyebiliriz (35), HbA_{1C} nin AKŞ ve üriner glukozdan daha anlamlı bir glisemik kontrol vasıtası olabileceği ileri sürülmüştür.

Hiperglisemiye bağlı olarak diğer doku proteinlerinin de glikozillendiği bilinmektedir (13,25,28,39,40). Bu protein glikolizasyonu, diyabetin nöropati, nefropati ve retinopati gibi komplikasyonlarını araştırmada da yardımcı olabilir (35), HbA_{1C} ilk keşfedildiği yıllarda bunun diyabet için bir genetik işaretçi olabileceği zannedildi. Daha sonraki çalışmalar (13,41) durumun böyle olmadığını göstermiştir. İdiopatik diyabetes melituslu hastalarda Cushing sendromuna bağlı olarak çıkan diyabetlilerde HbA_{1C} seviyelerinin önemli bir fark göstermediği tesbit edilmiştir (13).

Triwelli ve arkadaşları (42) ketoasidozlu veya enfeksiyonlu diyabetlilerde HbA_{1C} seviyeleri için en yüksek değerleri elde etmişlerdir. Aynı araştırmacılar tedavi süresi; böbrek, sinir, göz, periferik vasküler veya kardiyovasküler hastalıklar ve HbA_{1C} bir ilişki tesbit edememişlerdir. Şiddetli enfeksiyonu veya ketoasidozu olan diyabetlilerde, HbA_{1C} konsantrasyonu yüksek bulunmuştur (13,43). Bunun, daha önce metabolik kontrolün bozulmasından ileri geldiği düşünülmüştür.

HbA₁ veya HbA_{1C} nin çeşitli glisemik parametreler (AKŞ, herhangi bir anda alınan kan şekeri, üç ay önceki kan glukozu seviyelerinin ortalamaları, 24 saatlik idrar glukozu, serum kolesterol ve trigliseridleri, HDL ve LDL fraksiyonları) ile korelasyon gösterdiği (13) bilinmesine rağmen glikozillenmenin, daha sonra mikro veya makrovasküler komplikasyonlara nasıl sebep olduğu hala açıklık kazanamamıştır ve araştırılmaya muhtaçtır.

HbA_{1C} tayininin, iyi bir metabolik kontrol indeksi olabileceği açıktır. Ancak, HbA_{1C} teşekkül hızı, eritrosit ömrü, Pre-HbA_{1C} nin metoda bağlı olarak HbA_{1C} diye tayin edilmesi, anormal hemoglobinler, ilaçlar, üremi ve gebelik gibi çeşitli durumlar HbA_{1C} nin tayin ve yorumunda bir dizi problem olarak karşımızda durmaktadır.

THE GLYCOSYLATION OF HEMOGLOBIN, GLYCOSYLATED HEMOGLOBIN AND ITS CLINICAL IMPORTANCE

SUMMARY

In this paper, the glycosylation of hemoglobin, glycosylated hemoglobin and clinical significance are discussed on the basis of the publications on this subjects.

KAYNAKLAR

- 1- Kunkel, H.G., Wallenius, G., New hemoglobins in normal adult blood. *Science*. 122, 188, 1955.
- 2- Allen, D.W., Schroeder, W.A., Balog, J.: Observation on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal hemoglobin: a study of the effect of crystallization and chromatography in the heterogeneity and isoleucine content. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 1628-1632, 1958.
- 3- Schneck, A.G., Schroeder, W.A.: The relation between the minor components of whole normal human adult hemoglobin as isolated by chromatography and starch block electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.* 83; 1472-1478, 1961.
- 4- Huismann, T.J., Dozy, A.M.; Studies on the heterogeneity of hemoglobin, V. Binding of hemoglobin with oxidized glutathione. *J. Clin. Lab. Med.* 60; 302-319, 1962.
- 5- Ranbar, S.: An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin. Chim. Acta.* 22; 296-298, 1968.
- 6- Rahbar, S., Blumenfeld, O., Ranney, R.M.: Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36; 838-843, 1969.
- 7- McDonald M.J., Shapiro, R., Belichman, M., Solway, J., Bunn, H.F.: Glycosylated minor components of human adult hemoglobin: purification, identification and partial structural analysis. *J. Biol. Chem.* 243; 2327-2332, 1978.
- 8- Rahbar, S.: Glycosylated hemoglobins. *Tex. Rep. Biol. Med.* 40; 373-385, 1981.
- 9- Helmquist, W.R., Schroeder, W.A.: A new N terminal blocking group involving a Schiff base in hemoglobin A_{1C}. *Biochemistry*. 5; 2489-2503, 1966.
- 10- Bookchin, R.M., Gallop, P.M.: Structure of hemoglobin A_{1C}: Nature of the Nterminal beta chain blocking group. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32; 86-93, 1968.

- 11- Bunn, H.F., Haney, D.N., Gabbay, K.H., Gallop, P.M.: Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A_{1C}. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67; 103-109, 1975.
- 12- Bayer, H.: *Organic chemistry* (translated by Knoop). Greiswald 1963, 288.
- 13- Mayer, T.K., Freedman, Z.R.: Critical review-Protein glycosylation in diabetes mellitus: A review of laboratory measurements and of their clinical utility. *Clin. Chim. Acta.* 127; 147-184, 1983.
- 14- Gallop, P.M., Flückiger, R., Henneken, A., Minisohn, M.M., and Gabbay, K.H.: Chemical quantitation of hemoglobin glycosylation: Fluorimetric Detection of formaldehyde released upon periodate oxidation of glycoglobin, *Anal. Biochem.* 117; 427-432, 1981.
- 15- Mortensen, H.B., Volund, A., and Christophersen, C.: Glycosylation of human hemoglobin A. Dynamic variation in HbA_{1C} described by a biokinetic model. *Clin. Chim. Acta.* 136; 75-81, 1984.
- 16- Mortensen, H.B., and Christophersen, C.: Glycosylation of human hemoglobin, A, *Clin. Chim. Acta.* 137; 85-89, 1984.
- 17- Seligson, V.J., Vlassara, H., Abati, A., Cerami, A.: Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin, *J. Biol. Chem.* 252; 2998-3002, 1977.
- 18- Smith, R.J., Koenig, R.J., Binnerts, A., Soeldner, J.S., and Aoki, T.T.: Regulation of hemoglobin A_{1C} formation in human erythrocytes in vitro *J. Clin. Invest.* 69; 1164-1168, 1982.
- 19- Panzer, Z., Kronik, G., Lechner, K., Bettelheim, P., Meumann, E., and Dudczak, R.: Glycosylated hemoglobins (GHb): An index of red cell survival. *Blood.* 59 (6); 1348-1350, 1982.
- 20- Bridges, K.R., Schmidt, G.J., Jensen, M., Cerami, A., Bunn, H.F.: The acetylation of hemoglobin by aspirin. *J. Clin. Invest.* 56; 201-207, 1975.
- 21- Natham, M.D., Francis, T.B., and Palmer, J.L.: Effects of aspirin on determinations of glycosylated hemoglobin. *Clin. Chem.* 29 (3): 466-469 1983.
- 22- Casparie, A.F., Miedema, K.: Glycosylated hemoglobin in diabetes and renal failure. *Lancet*, 2; 758-759, 1977.
- 23- Widness, J.A., Schwartz, H.C., Charles, B.K., Om, W. and Schwartz, R.: Glycohemoglobin in diabetic pregnancy : A sequential study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 136; 1024-1029, 1980.
- 24- Fitzgibbons, J.F., Koler, R.D., Jones, R.T., Red cell age-related changes of hemoglobins A_{1a+b} and A_{1C} in normal and diabetic subjects. *J. Clin. Invest* 58; 820-824, 1976.

- 25- McWarry, B.A., Fischer, C., Hopp, A. and Nuehns, E.R.: Production of pseudodiabetic renal glomerular changes in mice after repeated injections of glycosylated hemoglobin. *Lancet*, 1; 738-740, 1980.
- 26- Robins, S.P., Bailey, A.J.: Age-related changes in collagen: The identification of reducible lysine-carbohydrate condensation products. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 48; 76-84, 1972.
- 27- Schnieder, S.L., Kohn, R.T.: Glycosylation of human collagen in aging and diabetes melitus. *J. Clin. Invest.* 66: 1179-1181, 1980.
- 28- Shin, Y.S., Stern, C., Endres, W.: Glycated hemoglobin and glycated: Evaluation of different methods in diabetic control. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22 (1); 47-51, 1984.
- 29- Ditzel, J., and Kjergaard, J.J.: Hemoglobin A_{1c} concentrations after initial insulin treatment for newly discovered diabetes. *Br. Med. J.* 1; 741-742; 1978.
- 30- Gonen, B., Rubenstein, A.H., Bochman, H., Tanega, S.P., and Horwitz, D.L.: Hemoglobin A₁: An indicator of the metabolic control of diabetic patients. *Lancet* 2; 734-736, 1977.
- 31- Sevensen, P.A., Christiansen, J.S., Welinder, B., and Nerup, J.: Fast glycosylations of hemoglobin, *Lancet*, 1; 630, 1979.
- 32- Leslie, R.D.G., Pyke, R.A., John, P.N., and White, J.M.: Fast glycosylation of hemoglobin. *Lancet*, 1; 773-774, 1979.
- 33- Widness, J.A., Rogler-Brown, T.L., McCormick, K.L., Petzold, K.S., Susa, J.B., Schwartz, H.C.: Rapid fluctuations in glycohemoglobin (hemoglobin A_{1c}) related to acute changes in glycose. *J. Lab. Clin. Med.* 95; 386-394, 1980.
- 34- Widness, J.A., Schwartz, C., Thompson, D., King, T.C., Kahn, C.B., Oh, W., and Schwartz H.C.: Glycohemoglobin (HbA_{1c}): A predictor of birth weight in infants of diabetic mothers. *J. Pediatr.* 92 (1): 8-12, 1978.
- 35- Cerami, A., Koenig, A., and Peterson, C.M.: Annotation: Hemoglobin A_{1c} and diabetes mellitus. *Br. J. Haematol.* 38; 1-4, 1978.
- 36- Kennedy, A.L., and Merimee, T.J.: Glycosylated serum protein and hemoglobin A₁ levels to measure control of glycemia. *Annals of Int. Med.* 95; 56-58, 1981.
- 37- Golstein, D.E.: Is glycosylated hemoglobin clinically useful. *New. Eng. J. Med.* 310 (6); 384-385, 1984.
- 38- Harper, H.A., Rodwell, V.M., and Mayes, P.A.: Review of physiological Chemistry: San Francisco 1979, 204-205.
- 39- Dorchy, H., and Haumont, D.: Factors affecting glycosylated hemoglobin in diabetic children. *J. Pediatr.* 6; 160, 1982.

- 40- Bunn, H.F.: Nonenzymatic glycosylation of protein: Relevance to diabetes. Am. J. Med. 70; 325-330, 1981.
- 41- Tattersall, R. and Gale, E.: Patients self-monitoring of blood glucose and refinements of conventional insulin treatment. Am. J. Med. 70; 177-182, 1981.
- 42- Trivelli, V.A., Ranney, H.M., Lia, H.T.: Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. New, Eng. J. Med. 284; 353-357, 1971.
- 43- Parker, K.M., England, J.D., Costa, J.D., Hess, R.L., and Gldstein, D.E.: Improved colorimetric assay for glycosylated hemoglobin. Clin. Chem. 27 (5); 669-672, 1981.