

GLİKOZİLE HEMOGLOBİN(HbA1c) ÖLÇÜMÜ VE DİABETES MELLİTUSUN UZUN DÖNEM GLİSEMİK KONTROLÜNDE KULLANILMASI

Ecz. İsmail KURT (*)

Gülhane Tıp Dergisi 45 (4) : 387-395 (2003)

ÖZET

Bu makalede, glikozile hemoglobinin (HbA1c) biyokimyası, laboratuvar ölçümleri ve diabetes mellitusun uzun dönem glisemik kontrolunun takibinde kullanılması gözden geçirildi.

Diabet tedavisinde hastaların glisemik durumlarının takibi çok önemlidir. Diabetik hastaların glisemik durumlarının takibinde en yaygın kullanılan testler kan glukoz ve glikozile hemoglobin(HbA1c) ölçümüdür.

Kan glukoz ölçümü, günlük glisemik durumun göstergesi iken HbA1c geçmiş 2-3 aylık dönemdeki ortalama glukoz değerini yansıtır ve diabet komplikasyonlarının gelişme riskinin bir göstergesidir.

HbA1c, tüm diabetik hastaların glisemik kontrol durumunun ortaya konması için glisemisi iyi kontrol edilen hastalarda yılda 2 kez, iyi kontrol edilemeyen-örneğin insülin kullananlarda-3 ayda bir yapılmalıdır. Ancak günümüzde, HbA1c ölçeği 30'dan fazla çeşitli bulunmakta ve bu metotlar ölçtükleri bileşik, etkilenim açısından farklılık göstermektedirler. Bunların uluslararası düzeyde standardizasyon çalışmaları halen devam etmektedir. Klinisyenler, sonuçların yorumunda metot karakterlerini ve muhtemel etkileyen faktörleri (örn, hemoglobino-patiler) göz önüne almalıdırlar.

Anahtar Kelimeler: Glikozile Hemoglobin, HbA1c, Diabetes Mellitus.

SUMMARY

Glycated Hemoglobin(HbA1c) Determination and its Utilization for Monitoring Long-Term Glycemic Control of Diabetes Mellitus

In this article, biochemistry and methods of determination of glycated hemoglobin (HbA1c) and their utilization for monitoring long-term glycemic control of diabetes mellitus are reviewed.

Monitoring the glycaemic state of patients is cornerstone of diabetic care. The tests used most widely in monitoring the glycemic status of people with diabetes are blood glucose and glycated hemoglobin.

As blood glucose level determination is an indicator of acute glycemic state, HbA1c value reflects mean glucose level during the previous 2-3 months' period and is a useful indicator for risk assessment of diabetic complications.

HbA1c levels of the all diabetic patients should be determined at the commencement of treatment as well as for monitoring purposes with the interval of twice a year and once in each three months period, for stable diabetic cases and for unstable cases like insulin dependent diabetics, respectively.

Despite existence of more than 30 various methods for determination of HbA1c level in blood samples, each technique has its unique property concerning the analyte determined and the sorts of interferences. Nevertheless, the effort for the internationally accepted standardization for determination of HbA1c levels is yet on the way.

Thus, physicians should take the method characteristics and the possible interferent analytes (e.g. hemoglobinopathies) of the technique employed for HbA1c determinations into consideration, while evaluating the results of the tests.

Key Words: Glycated Hemoglobin, HbA1c, Diabetes Mellitus.

GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), dünya nüfusunun yaklaşık %5-10'nu etkileyen, glukozun az kullanılmasına bağlı hiperglisemi ile kendini gösteren bir grup karbohidrat metabolizma bozukluğudur.

Diabetin akut komplikasyonları ciddi olsalar da, bu hastalardaki morbidite ve mortalitenin çoğundan hastalığın uzun dönemdeki mikro ve makrovasküler komplikasyonları sorumludur. Yapılan iki çalışma, (Diabetes control and complications trial-DCCT ve United Kingdom prospective diabetes study-UKPDS), sırayla Tip 1 (insuline bağımlı) ve Tip 2 (insulinden bağımsız) diabetik hastalarda, mikrovasküler komplikasyonların (retinopati, nefropati, nöropati) gelişme ve ilerleme riskinin doğrudan glisemik kontrol derecesi ile ilgili olduğunu göstermiş ve bu

(*) GATA, Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD.
Reprint Request: Ecz. İsmail KURT, GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya ABD. 06018, Etlik/ANKARA
Kabul Tarihi: 30.10.2003

çalışmalarda, glisemik kontrolün takibinde "glikozile" hemoglobin (GHb) kullanılmıştır(1,2). Bu çalışmalarda, diabette mikrovasküler komplikasyonların gelişme riskinin tahmininde GHb ölçümünün yararının gösterilmesi, birçok ulusal kuruluşun glisemik kontrolün en iyi takibinin GHb ile yapılabileceğini ilan etmeleri ile sonuçlanmıştır(3,4). Bu ise, laboratuvarların GHb ölçüm yükünü arttırmış ve GHb ölçümü rutin biyokimyasal analizler dışında en çok istenen laboratuvar testi haline gelmiştir(3).

Diğer yandan günümüzde laboratuvarların bir numaralı problemi ne sebeple olursa olsun (örn, uygunsuz test isteği, kullanımı, çeşitli nedenlerle tüketimin körüklenmesi vb.) maliyet problemidir(5). Bunu azaltmanın en etkin yolu, hekim ile laboratuvar uzmanları arasındaki ilişkinin arttırılmasıdır. Laboratuvar test sayısında artış ve özellikle test teknolojisindeki hızlı değişimler hekimleri bunları takipte sıkıntıya sokmuştur. Bu nedenle laboratuvar sorumluları, klinisyenleri laboratuvar test istekleri ve sonuçlarının yorumu açısından aydınlatmalıdır. Bu, test isteğini azaltarak maliyeti düşürebileceği gibi, iş yükü azalmasına yol açarak laboratuvar hizmetinde toplam kalitenin sağlanması ve devamına da olanak sağlayabilir(5,6).

Bu yazıda, glikozile hemoglobin testi ile ilgili analitik konular ve klinik kullanımı son gelişmelerin ışığında gözden geçirilerek, klinisyen tarafından testin etkin kullanılması ve böylece hasta tedavi etkinliği ve test yükünün azaltılmasına katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

DIABETES MELLİTUSTA GLİSEMİK KONTROLÜN TAKİBİ

Bu amaçla kullanılan testler, idrar glukoz, ketonlar, kan glukoz ve glikozile proteinlerden (hemoglobin ve serum proteinleri) oluşur. 1975'ten önce rutin hasta takibi evde yapılan idrar şeker/glukoz ve keton analizi ve arada bir laboratuvarda yapılan kan glukoz analizleri ile yapıyordu(7). 1975'ten sonra diabetin kronik komplikasyonlarının kronik hiperglisemiye bağlı olduğunun anlaşılması ile, 1990'larda günlük takipte idrar glukoz testi yerini kapiller kan glukoz ölçümüne bırakmıştır(8). Aynı sıralarda glikozile proteinlerin geçmiş aylardaki ortalama gliseminin klinik olarak faydalı bir göstergesi olduğunun saptanması ile bunlar diabetin uzun dönemdeki glisemik kontrolünün rutin takibinde kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde diabetik hastaların glisemik kontrollerinin takibinde en yaygın kullanılan iki test, kan glukoz ve GHb ölçümleridir.

Günlük glisemik kontrolün takibinde, sıklıkla kan glukoz ölçümü kullanılırken, uzun dönem glisemik kontrolün takibinde GHb ölçümü kullanılmaktadır.

DIABETES MELLİTUSTA UZUN DÖNEM GLİSEMİK KONTROLÜN TAKİBİ a-)GLİKOZİLE HEMOGLOBİN

Günümüzde, diabetik hastalarda, glisemik kontrolün göstergesi olarak en fazla kullanılan testtir ve aynı zamanda diabet komplikasyonlarının gelişme riskinin bir göstergesidir.

Glikozile hemoglobin veya HbA1c nedir?

Glikozile hemoglobin, "glycated" hemoglobin, glycosylated hemoglobin, HbA1c veya HbA1 terimlerinin hepsi de " nonenzimatik" olarak glukoz kalıntısı ilave edilmiş hemoglobini tanımlamak üzere kullanılmıştır. Ancak bu terimlerin birbiri yerine kullanılması hatalıdır. Glikohemoglobin ifadesi hatalı bir ifadedir, zira glikoproteinler karbohidrat kalıntılarının enzimatik olarak yapıya katıldığı proteinlerdir. Oysa, glikozile hemoglobin oluşumu enzimatik olmayan yani enzimin işe karışmadığı kendiliğinden gelişen bir olaydır.

Normal yetişkin hemoglobini, %97 hemoglobin A(yani HbA₀), ~ %2.5 HbA₂ ve ~%0.5 HbF'den oluşur. Hemoglobin de diğer birçok protein gibi enzimatik olmayan glikasyona uğrar. Hemoglobin A₀ molekülünün potansiyel glikasyon yerleri 4 polipeptid zincirinin (2 α ve 2 β) N-terminal amino asitin (valin) amino grubu ile zincirlerdeki lizin kalıntılarının tüm serbest ε-amino gruplarından oluşur. Ana glikasyon yeri, β-zincirlerinin N-terminal valin kalıntılarıdır ve glukoz bağlanmasının ~ %60'ından sorumludur. Diğer glukoz molekülleri hemoglobin molekülündeki ε-amino gruplarının oluşturduğu 44 glikasyon yerinin bir veya daha fazlasına veya α-zincirlerinin N-terminal valinine bağlanabilirler(9).

HbA1'in β-zincirinin N-terminal(valinin) amino grubuna glukoz bağlanması ile oluşan dayanıklı yapı [-(-1-deoksifruktozil) hemoglobin] Uluslararası Klinik Biyokimya Derneği (IFCC) tarafından HbA1c olarak tanımlanmıştır(10). HbA1c kandaki ana glikozile hemoglobindir ve HbA1 'in ~ %80'ni oluşturur.

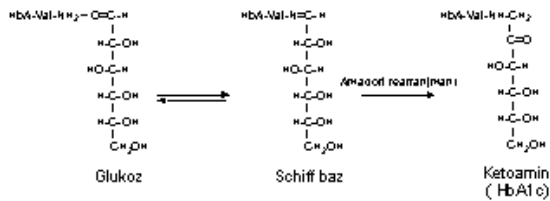
HbA1 ise, normal yetişkin hemoglobinin (HbA₁) karbohidrat (sadece glukoz değil) bağlanmış şekilleridir ve HbA1a, HbA1b, HbA1c'nin toplamından oluşur. HbA1a ve HbA1b ise, sırayla diğer şekerlerin (fosforillenmiş şekerler, örneğin fruktoz 1,6 difosfat) ve bilinmeyen karbohidratın HbA₀' ya bağlanması ile az miktarda oluşan ürünlerdir(11).

Glikozile hemoglobinler ifadesi daha genel bir ifadedir, HbA1 ve diğer hemoglobin-glukoz yapılarını (örn, glukoz-lizin kalıntı ve glukoz-a zincir N-terminal valin kalıntıları) içerir. Total glikozile hemoglobin ise, affinite kromatografi ile ölçülen HbA1c ve glukozun hemoglobindeki diğer yerlere bağlanması oluşan ürünleri(ε-amino grup-glukoz, α-zincir N-terminal valin-glukoz) tanımlar.

Her ne kadar başlangıçtaki çalışmalarda HbA1 ölçümü kullanılmış ve halen piyasada HbA1 ölçümü ile ilgili bazı ticari kitler varsa da, DCTT ve UKPDS klinik çalışmalarında HbA1c ölçülmüştür. HbA1c'nin adlandırılmasında ya sadece HbA1c veya "glycated" hemoglobin (GHb) ile birlikte kullanılabilirdi(12), hatta pratikte "A1c" testi şeklinde kullanılabilirdi(12), diğer tanımlamaların kullanılmaması (örneğin, glycosylated hemoglobin) önerilmiştir(13). Ancak, ülkemizde yaygın kullanım bulması nedeniyle bu yazıda, "glycated" hemoglobin yerine glikozile hemoglobin (GHb) kullanılacaktır.

Glikozile hemoglobin oluşumu

Glikozile proteinler, glukoz ile proteinler üzerindeki amino asitler arasında yavaş gelişen enzimatik olmayan reaksiyon sonucu posttranslasyonel olarak oluşurlar(10). Eritrositlerdeki glikozile hemoglobin ile serum glikozile proteinler benzer reaksiyonlarla oluşur. Hemoglobin glikasyonu 2 basamakta gerçekleşir (Şekil-1).



Şekil-1: Hemoglobin glikasyonu: Bu reaksiyonlar kendiliğinden oluşur. Aldimin (dayanaksız Schiff bazı) reversibl(iki yönlü) oluştuğundan plazma düzeyleri, glukoz düzeylerine bağlı dalgalanma gösterir. Ketoamin ise, irreversibl (dönüşümsüz) oluşur ve GHb testinde ölçülmesi gereken dayanıklı formdur.

Önce glukoz molekülü üzerindeki aldehit grubu, hemoglobinin molekülü üzerindeki amin grubu ile Schiff baz (aldimin) oluşturur. Bu reaksiyon ikiye yönlüdür. İkinci basamakta, Schiff baz Amadori rearranjanına uğrayarak ketoamin oluşturur. Bu reaksiyon irreversibldir. HbA1c, 2 beta zincirinin herbirindeki N-terminal valine bağlanmış glukoz kalıntısı taşıyan HbA₀ molekülünü tanımlar.

Hemoglobin açısından GHb sentez hızı, eritrositlerin maruz kaldığı glukoz konsantrasyonunun fonksiyonudur. Eritrosit zarı glukozu serbestçe geçirgen olduğundan HbA1c, geçmiş 120 günlük süredeki (ortalama eritrosit yaşam süresi) ortalama glisemisinin klinik olarak yararlı bir indeksidir(3). GHb, en doğru şekilde geçmiş 2-3 aylık dönemdeki glisemik kontrolü yansıtır. Her ne kadar HbA1c, 120 günlük eritrosit yaşamı süresince oluşursa da, 120 gün içinde son zamanlardaki glisemisinin daha fazla etkisi vardır. Gerçekten de teorik modeller ve klinik çalışmalar,

glisemisi iyi kontrol edilebilen hastaların HbA1c'lerinin %50'sinin örnek alınmasından önceki ay içinde, %25'nin ondan önceki ay, kalan %25'nin ise, önceki 2-4 ay içinde oluştuğunu göstermiştir(14). Bu değişim, vücudun eritrositleri devamlı yıkarak yerine yenilerini yapmasından kaynaklanmaktadır.

1970'lerdeki ilk klinik çalışmalardan sonra, 1980'lerde diyabet kontrol ve komplikasyon çalışmasında, 1 yıllık bir sürede laboratuvarlarda ölçülen kan glukoz profili ile multipl HbA1c ölçüm ortalaması arasında çok yüksek korelasyon saptanmıştır(r =0.80)(8).

Kan ve idrar glukoz, idrar keton testleri, diyabetin günlük kontrolü hatta kan glukozunda olduğu gibi, o andaki durum hakkında bilgi sağlarken, GHb geçmişteki uzunca bir zaman aralığında ortalama glisemisinin güvenilir bir göstergesidir ve bu nedenle, günlük kontrol için kullanılan kan glukozunun tamamlayıcısıdır. Rutin olarak, tüm diyabetik hastalarda başlangıçta glisemik kontrol durumunun belirlenmesi, daha sonrada tedavinin izlenmesinin bir parçası olarak GHb testi yapılmalıdır(3).

GHb ölçüm metotları

Günümüzde 30'dan fazla GHb ölçümü laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Bunlar, araştırma amaçlı metotlar, manuel minikolon sistemleri yanı sıra GHb ölçen otomasyon sistemlerini de kapsamaktadır. IFCC, HbA1c için referans materyal ve referans metot (HPLC -mass spektrometri veya kapiller elektroforez) geliştirmiştir(9). Rutin amaçlı kullanılan metotların çoğu ölçüm prensiplerine göre 2 gruba ayrılabilir(15):

1.Grup: Glikozile ve glikozile olmayan hemoglobinler arasındaki yük farklarına göre GHb'ni ölçen metotlar: Örn, katyon-exchange kromatografi, agar jel elektroforez

2.Grup: Glikozile ve glikozile olmayan hemoglobinler arasındaki yapısal farklılığa dayalı komponentleri ayıran metotlar. Örn: boronat affinite kromatografi, immunoassay

Yük bazlı metotların çoğu ve immunoassay metodu HbA1c'yi ölçerler. Diğer metotlar "total glikozile hemoglobin" ölçerler ki, bu HbA1c ve diğer hemoglobin-glukoz kalıntılarını (örn, glukoz-lizin kalıntısı ve glukoz-α zincir N- terminal valin kalıntısı) kapsar. Çoğu metotta sonuçlar total hemoglobinin yüzdesi (%) olarak verilmektedir.

Günümüzde rutin GHb ölçümleri laboratuvarlarda yapılmaktadır. 2002 yılının son aylarında geliştirilip reçetesiz satılan ve evde GHb ölçümüne olanak sağlayan Metrika A1c (www.a1cnow.com), FDA (US Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış ve NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) tarafından sertifikalandırılmıştır. Böylece

diabetik hastaların evde parmak ucundan aldıkları kanda, kendi kendine glukoz ile birlikte HbA1c ölçümü yapabilmelerine olanak sağlamıştır(16).

Genellikle, farklı ölçüm prensiplerini kullanan metot sonuçları çok iyi korelasyon göstermekteyse de herhangi bir metot veya analitin diğerinden klinik olarak daha üstün olduğunu gösteren inandırıcı veri yoktur(3).

Mamafih, aynı kan örneğinden verilen GHb sonuçları, ortak referansa göre standardize edilmedikçe oldukça farklı neticeler alınabilir. Örneğin, aynı kan bir laboratuvarında %7 diğerinde %9 okunabilir(17).

GHb sonuçları güvenilir ve karşılaştırılabilir mi?

Laboratuvarlar arası GHb sonuçları arasındaki farklılığı ortadan kaldırmak için, ABD'de 1996'da NGSP kuruldu ve bu organizasyon neticelerin "DCCT ekivalen" değer şeklinde verilmesini sağladı. DCCT metodu, HbA1c'yi ölçen HPLC-katyon exchange metotdur ve uzun dönem kesinliği <math><3\%</math>'dadır(18). Günümüzde Amerikan Diabet Cemiyeti(ADA) ve ABD ulusal klinik biyokimya akademisi(NACB), GHb ölçümlerinin sadece bu program tarafından sertifikaya edilen metotları kullanan laboratuvarlar tarafından yapılması ve taze kan örneklerini kalite kontrol örneği olarak dağıtan "CAP proficiency testing" programına katılmalarını önermektedir(3,12). Tüm sonuçların ölçüm metodunun tipine veya ölçülen özel bileşiğe bakılmaksızın "%HbA1c" veya "% HbA1c ekivalanı" olarak ifade edilmesi varılan ortak bir karardır(3,4).

Halen dünyada laboratuvarlar arası uyumu sağlamak amacıyla kurulan ve farklı referans materyal ve metot kullanan iki laboratuvarlar arası ağ (IFCC ve NGSP) vardır. Henüz iki ağ arasında tam bütünleşme sağlanamamıştır ve IFCC sonuçları kararlı bir şekilde NGSP neticelerinden %1.5-2.0 düşüktür. Halen bütünleşme çalışmaları devam etmektedir(12). Ancak bu şekilde HbA1c ölçümlerinde standardizasyon sağlandıktan sonra HbA1c ölçümleri, aynı kolesterol ölçümlerinin kardiovasküler risk gelişmesini tahmin etmede kullanıldığı gibi, diabetin birçok kronik komplikasyonlarının gelişme riskinin tahmininde kullanılabilir(3).

Preanalitik konular

1. Hasta ile ilgili değişkenler

Yaş, seks, etnik köken, ve mevsimin GHb üzerine klinik olarak önemli bir etkisi yoktur. Ancak yaşın etkisi konusunda fikir birliği yoktur. Bazı araştırmacılar, 30'lu yaştan sonraki her 10 yaşın sonuçlarda ~%0.1 artışa yol açtığını saptarken(19,20) diğerleri artışın çok az veya hiç olmadığını belirtmişlerdir(21). Akut hastalıkların sonuçları önemli oranda etkilemediği belirtildi(12). Aşağıdaki durumlar GHb sonuçlarını etkileyebilir:

a-) Çeşitli faktörler: Vitamin C ve vitamin E, muhtemelen hemoglobin glikasyonunu baskılayarak yanlış düşük test sonuçlarına neden olur, ancak bazı ölçümlerde vitamin C, değerleri yükseltir(12). Demir eksikliği anemisinin de test sonuçlarını yükselttiği ileri sürülmüştür(22). Gıda alımının test sonuçları üzerine önemli etkisi yoktur. Hipertrigliseridemi, hiperbilirubinemi, üremi, kronik alkoliz, kronik salisilat alınması ve opiat bağımlılığı bazı metotları etkileyerek, yanlış yüksek neticelere yol açabilir(14,23,24).

b-) Eritrosit ömrünü kısaltan veya ortalama eritrosit yaşını düşüren durumlar (örn, akut kan kaybından sonraki iyileşme dönemi, hemolitik anemi) metoda bakmaksızın test sonuçlarında yanlış düşüklüğe neden olurlar(17).

b-) Çeşitli hemoglobinopatiler (S,C,D, Graz, Padova vb.) eritrosit yaşam sürelerini kısaltma etkilerinden bağımsız olarak ve kimyasal olarak modifiye edilmiş hemoglobin türevleri (Örn, böbrek yetmezlikli hastalarda "carbamyated" Hb, fazla aspirin alan hastalarda asetillenmiş Hb) bazı ölçüm metotlarını etkileyebilir(25). Üremi üreden spontan olarak oluşan izotiyosiyanatın hemoglobinin özellikle, β -zincir N-terminal valinle reaksiyonu sonucu dayanıklı "carbamyated" hemoglobin(CHb) oluşumuna yol açar. CHb, ion-exchange bazlı tüm HPLC metotlarında yanlış yüksek HbA1c neticelerine yolaçar(26).

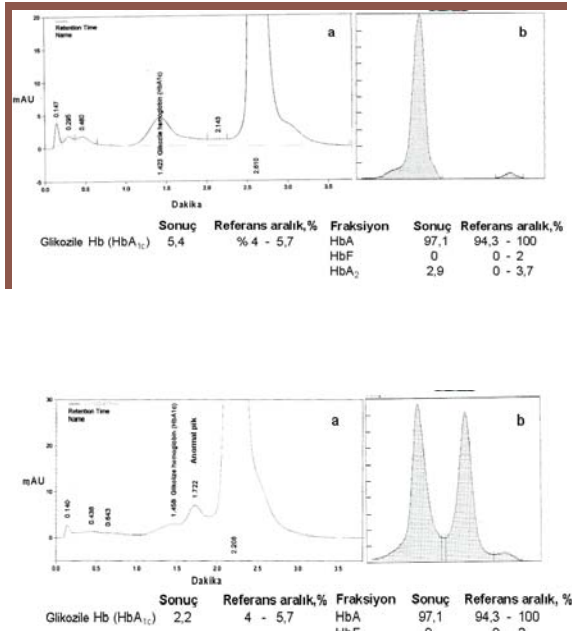
Hemoglobinopatinin tipine ve ölçüm metoduna göre sonuçlar yanlış artmış veya azalmış bulunabilir. Konu Bry L ve ark.(25) tarafından gözden geçirilmiştir ve bu konu ile ilgili bazı bilgiler, "National Glycohemoglobin Standardization Program" web sayfasında verilmiştir(27). Boronat affinite kromatografi ölçüm metotlarının, yük farklarına dayalı olarak glikozile ve glikozile olmayan komponentleri ayıran metotlara (örn, katyon exchange-HPLC metodu) göre hemoglobinopatilerden daha az etkilendiği kabul edilmektedir. Immunoassay metotlar da varyantın tipine göre yanlış sonuçlar verebilir(25). Örneğin HbS trait ve HbC trait 'li hastalarda bazı immunoassay metotlar yanlış sonuçlar verebilir(28).

Sickle cell hastalığı, homozigot Hb C hastalığı, HbSC hastalığı, ve β -talassemiye sıklıkla HbA2 ve HbF gibi minor hemoglobinlerin artışı eşlik eder ki bunlar, bazı GHb metotlarını etkileyebilir(25).

Çoğu katyon-exchange HPLC metotlarında olduğu gibi bazı vakalarda kromatogramların gözle incelenmesi varyant veya muhtemel etkilenme(interferans) açısından uyarıcı olabilir. Laboratuvarımızda kullanılan katyon-exchange HPLC metodunda, (HbA1c-Chromsystems Inst., Germany) düşük HbA1c(%2.2)'ye eşlik eden anormal kromatogram dikkati çekmiş ve hastanın kanında alkali pH da agaroz jel elektroforezi (SAS-MX Alkaline Hb, Helena,

Glikolize Hemoglobin

USA ile aşırı HbS artışı (%43.9) saptanmış ve daha sonra hastanın diğer hematolojik incelemeleri (sickle cell test vb) sonucu sickle cell trait olduğu anlaşılmıştır (Şekil-2).



Şekil-2: Sağlıklı bir birey (üst kısım) ve Hb varyantı(HbS) taşıyan hastanın (alt kısım) katyon-exchange HPLC metodu ile, HbA_{1c} analiz kromatogramları(a) ve alkalin pH agaroz jel elektroforez sonuçları (b)

Bu örnek, aynı zamanda katyon-exchange HPLC ile HbA_{1c} analizi sırasında anormal piklere dikkat edilerek, daha önce farkına varılmayan hemoglobinopatilerin saptanabileceğini göstermektedir. Toolis ve Worley (29), benzer olarak anormal kromatogramın incelenmesini takiben hematolojik analizler sonucu, hastada HbC (%36.5) saptamışlar ve bu metodun ayrıca hemoglobinopati taramasına katkıda bulunduğunu göstermişlerdir.

İnterferasyonlar, metoda özgü olduğundan herhangi bir glikolize hemoglobin metodu kullanılmadan önce yapımcı firma el kitapları gözden geçirilmelidir. Ölçüm metodu seçiminde, laboratuvar hizmet verilen hasta popülasyonunun karakterini (örn, hemoglobinopatilere veya böbrek hastalıklarına sık rastlanması gibi) göz önünde bulundurulmalıdır.

Hemoglobin varyantları, metoda bağımlı olarak GHb sonuçlarını etkilediklerinden etkilenmeyen metotlar seçilerek GHb ölçümü kullanılabilirse de, homozigot HbS, HbC ve HbSC hastalığı bulunan hastalarda, sonuçlar, var olan patolojik durum da (anemi, artmış eritrosit dönüşümü, transfüzyon) göz önüne alınarak dikkatle yorumlanmalıdır. Daha

doğrusu bu grup hastalarda, tüm GHb metotları uzun dönem glisemik kontrolün takibinde yetersizdir. Bunun yerine hemoglobin bazlı olmayan alternatif metotlar (örn, serum fruktozamin gibi) yararlı olabilir. Ancak bunun da sınırlamaları göz önünde bulundurulmalıdır(12).

2. Örnek toplama, taşıma ve saklama

Örnek olarak kapiller veya venöz kan kullanılabilir. Kan, yapımcı firma başkasını önermedikçe EDTA'lı tam kan olmalıdır(12). Örnek dayanıklılığı metoda özeldir. Genel olarak tam kan örnekleri 4°C de 1 hafta dayanıklıdır. Çoğu metotlar için tam kan -70 °C ve altında uzun süre (en az 1 yıl) dayanır, fakat -20°C'de dayanıksızdır. Örneklerin uygunsuz saklanması (örneğin yüksek sıcaklıkta saklama vb.) ölçüm metoduna da bağlı olarak saptanamayan önemli artefaktlar oluşturabilir. Son zamanlarda saha çalışmaları için filtre kağıtlı özel toplama sistemleri geliştirilmiştir, ancak bunlar metoda özeldir(30).

Analitık konular

GHb'nin intraindividual değişim katsayısı(CV) çok düşüktür(<%2). İntralaboratuvar CV<%3, interlaboratuvar CV<%5 sağlanabilmektedir. Buna dayanarak laboratuvarlara interassay CV< %5 (ideal < %3) olan GHb metotlarını kullanmaları önerilmiştir. Yine ölçüm performansını bağımsız değerlendirebilmek için her gün çalışmanın başında ve sonunda farklı ortalama değerleri olan (yüksek, düşük) iki kontrol materyalinin kalite kontrolde kullanılması önerilmiştir. Bu amaçla -70 °C ve daha soğukta tek kullanımlık porsiyonlar halinde dondurulmuş tamkan, kontrol materyali olarak uygundur ve ölçüm metoduna bağlı olarak aylar hatta yıllar dayanabilir. İdeali laboratuvar performansının kontrolünde hem ticari hem laboratuvar yapılan kontroller kullanılmaktadır(12).

Referans aralık

Yapımcı firmalar verse de, laboratuvarlar kendi referans aralığını saptamalıdır. Çalışma grubunu şişman olmayan ve açlık kan şekeri <110 mg/dl olan sağlıklı kontroller oluşturmalıdır. NGSP onaylı ölçüm metotlarının referans aralıklarının standart sapması <%0.5'dir. Bu metotların referans aralığının %4-6'dan çok fazla (örneğin; >%0.5) sapmaması gerekir(12).

Referans aralığın dışında çıkan örnekler

Laboratuvar referans aralığının alt sınırının altında ki tüm örnekleri tekrar etmelidir ve şayet onaylarsa, klinisyeni eritrosit yıkımı ve anormal hemoglobin olabileceği konusunda uyarmalıdır. Ayrıca > %15 GHb sonucu alınan örnekler (DM'lu hastalarda nadiren > %20 sonuç bulunur) tekrar ölçülmeli ve onaylanırsa hemoglobin varyantı veya olasılığı akla getirilmelidir (12,25).

Labil hemoglobinin alınması

GHb oluşması, "pre-A1c" veya labil A1c olarak adlandırılan Schiff baz ara maddesi üzerinden olur. Hiperglisemi sırasında bu madde hızla oluşabilir ve özellikle yük bazlı metotlar olmak üzere, bazı GHb metotlarını interfere edebilir. Bundan etkilenen metotlarda, labil A1c yi ortadan kaldıran yapıcı firma protokolu izlenmelidir.

GHb sonuçlarının yorumlanması ve klinik uygulanması

Test sonuçlarının doğru yorumu, ölçüm metodunun ve bilinen etkileşimlerinin (örn kısalmış eritrosit ömründen bağımsız hemoglobinopatilerden veya üremiden etkilenme) bilinmesini gerektirir ve bu nedenle sıkı laboratuvar-doktor ilişkisini gerektirir (12).

GHb ölçümleri günümüzde, DM'lu hastaların klinik tedavi yaklaşımının rutin bir parçasını oluşturmaktadır. Tedavi hedefi olarak ADA, GHb konsantrasyonunun < %7 tutulmasını, >%8 ısrar eden GHb konsantrasyonlarında, tedavi rejiminin gözden geçirilmesini önermektedir(3). Ancak, bu değerler DCCT göre kalibre edilmiş metotlar (yani referans aralığının %4-6 olduğu durumlar) için geçerlidir.

GHb'de her %1 değişim ortalama plazma glukoz değeri olarak ~35 mg/dl karşılık gelmektedir. DCCT ile alakalı HbA1c test sonuçları ile ortalama plazma glukoz değerleri arasındaki ilişki Tablo-I'de verilmiştir (31):

TABLO-I
HbA1c İle Ortalama Plazma
Glukoz Değerleri Arasındaki İlişki

HbA1c(%)	6	7	8	9	10	11	12
Ortalama plazma glukoz(mg/dl)	135	170	205	240	275	310	345

Diabetik hastalarda, GHb değerleri bir spektrum gösterir; az sayıda hastadaki normal GHb değerlerinden (ortalama plazma glukoz değerleri normal aralığa düşen veya çok yakın olanlar) çok artmış değerlere (normalin iki-üç katı) kadar bir aralıkta değerler bulunabilir. Diğer deyimle, >%9.5 HbA1c değeri bazı hastalarda çok yüksek hiperglisemiye karşılık gelebilir. Bu nedenle tedavi bireyselleştirilmelidir(3). GHb değerlerinde %10 düşme (örn, %12 →%10.8) veya %8 → %7.2'ye) diabetik retinopati ilerleme riskini ~ %45 düşürür. Yine düşük GHb neticelerine artmış ciddi hipoglisemi riski eşlik eder(12).

GHb test sonuçlarının doğru yorumlanması, GHb değerleri ile ortalama plazma glukoz değerleri arasındaki ilişkiyi, GHb kinetikleri ve kullanılan metodun sınırlama ve etkileşimlerinin bilinmesini gerektirir. GHb'de zaman içinde küçük değişimler (örn, ±%0.5

GHb) glisemik durumdaki gerçek değişimlerden ziyade ölçümdeki oynamaları yansıtır(12). Wiener K. (32), kan şekeri yüksek iken (200 mg/dl) çok düşük GHb sonucu (%1.4) çıkan bir diabetik hastada daha sonra yaptıkları hematolojik incelemeler sonucu, buna otoimmün hemolizin neden olduğunu (Hb 7.7 g/dl) ve GHb düzeylerinde düşmenin her zaman diabet kontrolünde düzelme anlamına gelmeyeceğine dikkat çekmiştir.

GHb testi isteme sıklığı

GHb testinin yapılma sıklığı konusunda fikir birliği yoktur. Herhangi bir hasta için, bu sıklık doktorun kararına bağlıdır. Ancak konunun uzmanları, oral antidiabetik tedavi alan hedefi tutturulan hastalar için (stabil glisemik kontrol) yılda 2 kez, insülinle tedavi olan ve tedavi hedefi tutturulamayan hastalar için, tedavi değişimi sırasında veya kan glukozu yükseldiği zamanlarda daha sık olarak yılda 4 kez (3 ayda bir) GHb testi yapılmasını önermektedir(33). Bu öneriler hem tip 1 hem de tip 2 diabetik hastalar için geçerlidir. Özellikle tip 1 diabetik hastalarda, seri olarak yılda 4 kez GHb ölçümü yapmanın GHb değerlerinde önemli düzelmeler sağladığı gösterilmiştir(34).

GHb'nin diabet taraması ve tanısında kullanılması

Bu konu halen tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar (35), GHb değerlerinin sağlıklı kişilerde zamanla tek bir bireyde çok az değişmesine karşın kişiler arasında çok değişmesi nedeniyle, (yani interindividual varyasyon, intraindividual varyasyon oranının yüksek olması), GHb ölçüm metotlarının analitik değişimlerinin düzeltilmesine rağmen diabet taramasında kullanılmayacağını, herkesin dar bir referans aralığı olduğu ve kişisel referans aralıklarının kişiden kişiye çok değiştiğini ortaya koymuştur. Bu bulgu aynı zamanda, glisemik kontrolün takibinde kişinin değerlerindeki değişimlerin takibinin önemli olduğuna dikkat çekmektedir.

ADA halihazırda diabet tarama ve tanısında GHb'nin kullanılmasını önermemektedir(36). Ancak Tormey ve ark.(37), transplant vericisinde kalbin durması gibi acil durumlarda hastaların, GHb sonuçlarının hastada diabet olup olmadığının anlaşılmasında kullanılabileceğini ve bu anlamda, GHb'nin acil testler içine dahil edilmesini önermektedir. Araştırmacı bulduğu %7.1 GHb sonucunun çok büyük olasılıkla hastanın diabet olduğunu gösterdiğini, zira meta analiz çalışmasında(38) GHb ≥ %7 sonucu olan kişilerin ancak %4'de oral glukoz tolerans bozukluğu bulunduğu ileri sürmüştür. Yine Gouille JP ve ark.(39) GHb'nin alkolik veya uzun süre açlığa bağlı ketoasidozun diabetik ketoasidozdan ayırımına olanak sağlayarak postmortem diabetik bozukluğun gösterilmesinde yararlı bir gösterge olduğunu saptadılar.

b-) GLİSEMİK KONTROLDE GLİKOZİLE SERUM PROTEİNLERİNİN (GSP) VE DİĞER TESTLERİN YERİ

Hemoglobinde olduğu gibi plazma proteinlerinin de, (çoğu albumindir) amino grupları ile glukoz arasında yavaş ilerleyen enzimatik olmayan reaksiyonla postranslasyonel olarak glikozile plazma proteinleri oluşur(10,40). GSP, total GSP veya glikozile serum albumin(GSA) şeklinde ölçülebilir. GSP ve GSA için birçok ölçüm metodu geliştirilmişse de en yaygın kullanılanı fruktozamin ölçümüdür.

İnsan serum albumin dönüştürümü (yarı ömrü 14-20 gün), hemoglobinden (eritrosit yaşam süresi 120 gün) çok daha kısa olduğundan serum GSP konsantrasyonu, GHb konsantrasyonuna göre çok daha kısa süredeki glisemik indeksi yansıtır. Tek bir GHb ölçümü, geçen 2-3 ay gibi uzunca bir süredeki glisemik durumu yansıtırken, tek bir fruktozamin ölçümü, geçmiş 1-2 haftadaki glisemik durumun göstergesidir. Serum fruktozamin sonuçları, diabetik hamileler veya tedavide önemli değişiklik yapıldığı durumlarda, glisemik durumdaki nisbeten kısa süredeki değişimleri göstermede kullanılmıştır(41).

Serum fruktozaminin GHb sonuçları ile korelasyonu iyidir(3,42). Daha kısa süredeki glisemik kontrolü gösterdiğinden, GHb yılda 3-4 kez ölçülerek kazanılan bilgi serum fruktozamin her ay ölçülerek elde edilebilir. Ancak bu ölçümün, klinik kullanımı ile ilgili yeterli çalışma yoktur. Diğer deyimle, GHb'den farklı olarak serum fruktozaminin diabetin kronik komplikasyonlarının gelişme ve ilerlemesi ile ilişkisi gösterilmemiştir.

Ancak GHb ölçümü ile serum fruktozamin birbirini tamamlayabilir: GHb'nin ölçülemediği veya yararlı olmadığı (örn, hemolitik anemi) gibi durumlarda tedavi rejiminin kontrolünde serum fruktozamin ölçümü yararlı olabilir. Ancak serum fruktozamin konsantrasyonunda, akut sistemik hastalıklar veya karaciğer hastalıklarında görülebilen protein sentez veya temizlenmesindeki değişimlere bağlı oynamalar görülebilir. Serum fruktozamin sonuçlarının, serum albumin veya total protein konsantrasyonlarına göre düzeltilip düzeltilmemesi konusu tartışmalıdır(3).

Diğer yandan, 1, 5 anhidroglusitol (43) ve ileri glikasyon son ürünü(AGE)(44) gibi diğer testlerinde kronik diabet komplikasyonlarının gelişme riskini tahminde klinikte yararlı olup olmadıkları henüz saptanmış değildir.

Pratik öneriler:

1. Diabette uzun dönem glisemik kontrolün takibinde en iyi test HbA1c'dir.Tüm hastalarda başlangıçta ve tedavi takibinde ölçülmelidir.

2. Örnek alımında açlık tokluk fark etmez günün herhangi bir saatinde alınabilir. Örnek, EDTA'lı tamkandır ve uzun süre aşırı sıcakta bekletilmeden (sonuçları etkileyebilir) laboratuvara oda ısısında ulaştırılmalıdır. Kan 4 °C'de 1 hafta, -70 °C'de en az 6 ay saklanabilir. -20 °C'de saklanamaz.
3. HbA1c, son 2-3 ay içindeki ortalama kan glukozunun göstergesidir. İyi kontrol edilebilen (örn, tip 2 diabetik hastalarda) yılda 2 kez yapılması yeterlidir. Tip 1 diabetiklerde ise 3 ayda bir yapılmalıdır. Tedavi değişiminde en iyi cevap 2-3 ay sonraki test sonucunda yansır. Sık test yaptırmanın yararı yoktur.
4. Rutin kullanımda farklı ölçüm prensipleri olan (sonuçta kalibrasyonları, ölçtükları hemoglobin türevleri ve etkilenimleri de farklıdır) 30'dan fazla GHb metodu bulunmaktadır. Bu nedenle ülkemizde laboratuvar sonuçlarının birebir değil ancak kabaca karşılaştırılabilineceği hatırd tutulmalı ve hasta takibi mümkün olduğu kadar aynı metotla yapılmalıdır.
5. HbA1c sonuçlarında küçük değişimler (~%0.5), ölçüm oynamalarından kaynaklanabilir ve %1 oynama ~35 mg/dl ortalama kan glukoz değişimine karşılık gelir.
6. HbA1c sonuçları yorumlanırken (özellikle, beklenmeyen sonuçlarla karşılaşıldığında) hastanın ölçümü etkileyen faktörleri, (hemoglobinopati, hemoliz, üremi gibi) taşıyıp taşımadığı kontrol edilmelidir.
7. HbA1c'nin her ne kadar diabetes mellitus taramasında kullanılması önerilmiyorsa da,
a-) Temaruz (suistimal) vakalarının aydınlatılmasında,
b-) Hastada diabet olup olmadığının çeşitli nedenlerle kan glukozu ile karar verilemediği (uygun örneğin sağlanamaması veya uygunsuz örnek) acil veya adli tıp vakalarında DM tanısında kullanılabilir.
8. HbA1c, eritrosit dönüştürümünün arttığı homozigot veya "compaund"(ikili) heterozigot hemoglobinopatiler (HbSS, HbCC, HbSC) gibi durumlarda glisemik kontrolde kullanılamaz. Bu tür durumlarda dahil, HbA1c ölçümünün yararlı olmadığı (örn, hemolitik anemi) durumlar ve HbA1c'nin ölçülemediği durumlarda tedavi rejiminin kontrolünde serum fruktozamin ölçümü yararlı olabilir. Serum fruktozamin ölçümü ayda bir yapılması yeterlidir.

KAYNAKLAR

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med* 329:977-986,1993.
2. UK Prospective Diabetic Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352:837-853,1998.
3. American Diabetes Association: Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 26: (Supp 1) S106-S108, 2003.
4. Marshall, S.M., Barth, J.H.: Standardization of HbA1c measurements: a consensus statement. *Ann Clin Biochem* 37: 45-46, 2000.
5. Lundberg, G.D.: How clinicians should use the diagnostic laboratory in a changing medical world. *Clin Chim Acta* 280: 3-11, 1999.
6. Plebani, M.: The clinical importance of laboratory reasoning. *Clin Chim Acta* 280: 35-45, 1999.
7. Service, F.J., Molnar, G.D., Taylor, F.T.: Urine glucose analysis during continuous blood glucose monitoring. *JAMA* 222: 294-298, 1972.
8. American Diabetes Association: Self-monitoring of blood glucose (Consensus statement). *Diabetes Care* 10: 95-99, 1987.
9. Miedema, K.: Monitoring of diabetes mellitus. *eJIFC vol 13(5)*,2002 <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol13no5/1305200216.htm>
10. Jeppsson, J-O., Kobold, U., Ban, J., et al.: Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med* 40: 78-89, 2002.
11. Bunn, H.F.: Nonenzymatic glycosylation of protein: relevance of diabetes. *Am J Med* 70: 331-338, 1981.
12. Sacks, D.B., Bruns, D.E., Goldstein, D.E., Maclaren, N.K., McDonald, J.M., Parrott, M.: Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 48: 436-372, 2002.
13. Roth, M.: "Glycated hemoglobin", not "glycosylated" or "glucosylated"(Letter) 29: 1991, 1983.
14. Tahara, Y., Shima, K.: Kinetics of HbA1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. *Diabetes Care* 18: 440-447, 1995.
15. Goldstein, D.E., Little, R.R., Wiedmeyer, H.M., England, J.D., Mc, Kenzie, E.M.: Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. *Clin Chem* 32: 664-670, 1986.
16. US. Food and Drug Administration : FDA clears home glycated hemoglobin for test for diabetes FDA Talk papers (T02-55) December 17, 2002 (<http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/2002/ANS01182.html>)
17. Goldstein, D.E., Little, R.R., Lorenz, R.A., Malone, J.I., Nathan, D., Peterson, C.M.: Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 18: 896-990, 1995.
18. Little, R.R., Rohlfing, C.L., Wiedmeyer, H-M., Myers, G.L., Sacks, D.B., Goldstein, D.E.: The national glycohemoglobin standardization program(NGSP): a five-year progress report. *Clin Chem* 47: 1985-1992, 2001.
19. Nuttall, F.Q.: Effect of age on the percentage of hemoglobin A1c and the percentage of total glycohemoglobin in non -diabetic persons. *J Lab Clin Med* 134: 451-453, 1999.
20. Hashimoto, Y., Futamura, M.: Effect of aging on HbA1c in a working male Japanese population. *Diabetes Care* 18:1337-1349, 1995.
21. Wiener, K., Roberts, N.B.: Age does not influence levels of HbA1c in normal subject. *QJM* 2:169-173,1999.
22. Tarim, O., Kucukerdoğan, A., Gunay, U., Eralp, O., Ercan, I.: Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A1c in type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Int* 41: 357-362, 1999.
23. Nathan, D.M., Francis, T.B., Palmer, J.L.: Effects of aspirin on determination of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 29: 466-469, 1983.
24. Stevens, V.J., Fanti, W.j., Newma, C.B., Sims, R.V., Cerami, A., Peterson, C.M.: Acetaldehyde adducts with hemoglobin. *J Clin Invest* 67: 361-369, 1981.
25. Bry, L., Chen, P.C., Sacks, D.B.: Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 47:153-163, 2001.
26. Weykamp, C.W., Miedama, K., de Haan, T., Dolemen, C.: Carbamylated hemoglobin interference in glycohemoglobin assays(Letter). *Clin Chem* 45: 438-440, 1999.
27. National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP): <http://www.missouri.edu/~diabetes/ngsp.html>.
28. Roberts, W.L., Chiasera, J.M., Ward-Cook, K.M.: Glycohemoglobin results in samples with hemoglobin C or S trait: A comparison of four test systems. *Clin Chem* 45:906-908, 1999.
29. Toolis, F.; Wortley, L.: Hemoglobinopathy diagnosed on HbA1c analysis. *Ann Clin Biochem* 40: 194-197, 2003.
30. Rendell, M., Brannan, C., Nierenberg, J., Rasbold, K., Hestorff, T: Fingerstick glycosylated hemoglobin, plasma protein, and albumin. *Diabetes Care* 10: 629-632, 1987.

31. Rohlfing, C.L., Wiedmeyer, H.M., Little, R.R., England, D.J., Tennill, A., Goldstein, D.E.: *Defining the relationship between plasma glucose and HbA1c: analysis of glucose profiles and HbA1c in Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Care* 25: 275-278, 2002.
32. Wiener, K.: *A falling HbA1c is not necessarily an indicator of improving diabetes control. Ann Clin Biochem* 38: 406-407, 2001.
33. American Diabetes Association. *Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. Diabetes Care* 26: (Supp 1), S35-S50, 2003.
34. Larsen, M.L., Horder, M., Mogensen, E.F.: *Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin dependent diabetes mellitus. N Eng J Med* 323: 1021-1025, 1990.
35. Kilpatrick, E.S., Maylor, P.W., Keevil, B.G.: *Biological variation of glycosylated hemoglobin. Implication for diabetes screening and monitoring. Diabetes Care* 21: 261-264, 1998.
36. *The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care* 26: (Supp 1) S5-S20, 2003.
37. Tormey, W.P., Hickey, D.P.: *An urgent use of hemoglobin A1c? Clin Chem* 43: 1463, 1997.
38. Peters, A.L., Davidson, M.B., Schringer, D.L., Hasselblad, V.: *A clinical approach for the diagnosis of diabetes mellitus: an analysis using glycosylated hemoglobin levels. Meta-analysis research group on the diagnosis of diabetes using glycosylated hemoglobin levels. JAMA* 276: 1246-1252, 1996.
39. Gouille, J.P., Lacroix, C., Bouige, D.: *Glycosylated hemoglobin: a Useful post-mortem reference marker in determining diabetes. Forensic Sci Int* 128: 44-49, 2002.
40. Kurt, İ., Kutluay, T., Karaca, L.: *Klinik Biyokimya analitik gözden geçirme: Serum glikozile protein ölçüm yöntemleri. Biyokimya Dergisi* 18: 109-138, 1993.
41. Frandsen, E.K., Sabagh, T., Bacchus, R.A.: *Serum fructosamine in diabetic pregnancy. Clin Chem* 34: 316-319, 1988.
42. Beyhan, Z., Çorakçı, A., Arpacı, F., Gündoğan, M.A., Kurt, İ.: *Diabetes mellitusta glisemik kontrolün değerlendirilmesinde HbA1c ile fruktozaminin karşılaştırması. Türk Diabet Yıllığı*, 7: 133-140, 1988-1989.
43. Yamanouchi, T., Ogata, N., Tagaya, T., Kawasaki, T., Sekino, N., Funato, H., Akaoka, L., Miyashita, H.: *Clinical usefulness of serum 1,5-anhydroglucitol in monitoring glycaemic control. Lancet*. 347(9014):1514-8, 1996.
44. Makita, Z., Radoff, S., Rayfield, E.J., Yang, Z., Skolnik, E., Delaney, V., et al.: *Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. N Eng J Med* 325: 836-842, 1991.