

## De rol van niet-enzymatische glycosyleringsproducten bij het disfunctioneren van het endotheel en het ontwikkelen van vasculaire complicaties bij diabetes mellitus

C.G. SCHALKWIJK<sup>1,3</sup>, V.W.M. van HINSBERGH<sup>3,4</sup>, C.D.A. STEHOUWER<sup>2,3</sup>

Patiënten met diabetes mellitus hebben als gevolg van ontregeling van het glucose- en insulinemetabolisme een verhoogd risico op het optreden van microvasculaire complicaties, zoals nefropathie en retinopathie, en macrovasculaire complicaties met als uitingvorm atherosclerose. De gezondheid en de levensverwachting bij patiënten met diabetes mellitus worden in aanzienlijke mate door deze complicaties bepaald. Er zijn goede aanwijzingen dat het functioneren van het endotheel in diabetische vaten gestoord is en de veronderstelling is dat juist dit disfunctioneren van het endotheel een belangrijke rol speelt bij het optreden van vasculaire complicaties (1). In de Diabetes Control and Complication Trial (2) is vastgesteld dat hoge glucosespiegels de centrale factor is voor het optreden van met name vasculaire complicaties. De duur en de hoogte van hyperglycemie zijn sterk gecorreleerd aan vasculaire ziekten. Echter, het pathofysiologisch mechanisme dat leidt tot het slecht functioneren van het endotheel is niet precies bekend. Eén van de mechanismen die het disfunctioneren van het endotheel zou kunnen verklaren betreft niet-enzymatische glycosyleringsreacties en de vorming van 'advanced glycation end products' (AGE's). We bespreken hier dat AGE's kunnen leiden tot het disfunctioneren van het endotheel, tot een metabole ontregeling van de vaatwand en tot een verhoogde kans op het optreden van vasculaire complicaties.

### Glyceringsreactie

Glucose en andere monosacchariden kunnen snel en reversibel reageren met zowel eiwitten als lipiden. Niet-enzymatische glycosyleringen op vrije N-terminale aminogroepen en de  $\epsilon$ -aminogroep van lysineresiduen van eiwitten, als ook op de aminogroep van serine van fosfatidylserine, leiden tot een snelle reversibele vorming van Schiff-base en vervolgens tot stabielere Amadori-producten. Wanneer glycering optreedt op het hemoglobine wordt het bekende Amadori-product geëlyceerd hemoglobine (HbA1c)

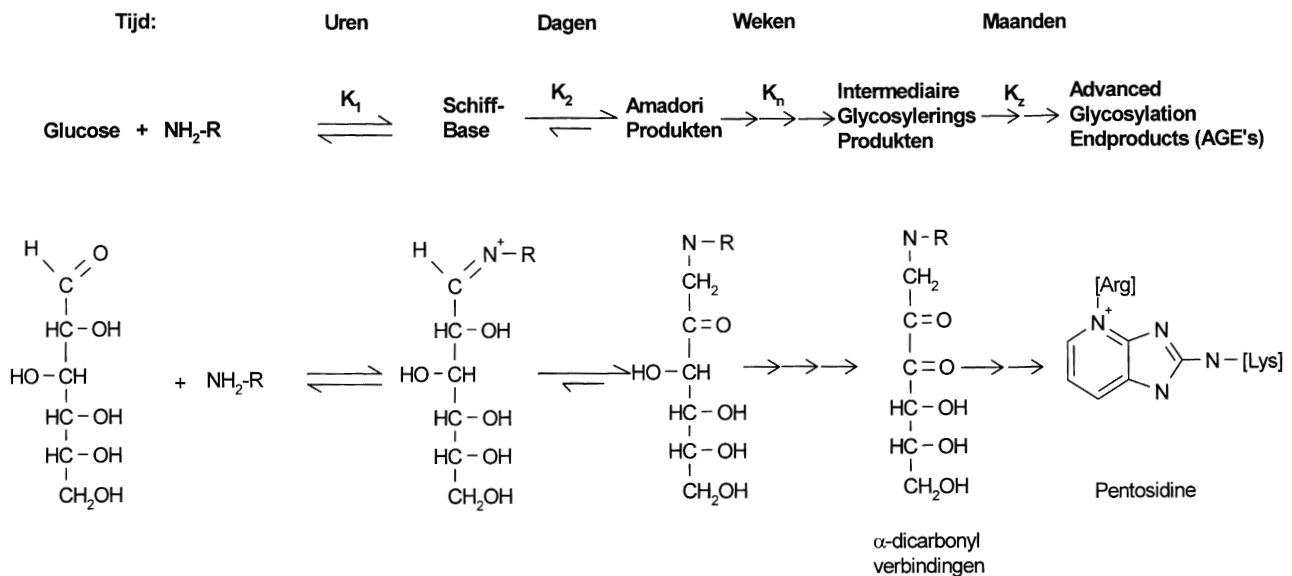
gevormd. HbA1c wordt in de kliniek veelvuldig gebruikt als maatstaf voor de glucose instelling over de laatste 5 tot 6 weken van patiënten met diabetes mellitus (3). Ook serumeiwitten kunnen geëlyceerd worden tot Amadori-producten en het fructosaminegehalte in het serum is een maat voor de glycosyleringsgraad van serumeiwitten en is een afspiegeling van het gemiddelde glucosegehalte van het bloed over de laatste 2 tot 4 weken (4). Op met name eiwitten met een lange halfwaardetijd kunnen uit Amadori-producten, door dehydratatie, langzame chemische omleggingen en oxidatie-reductie-reacties, irreversibel AGE's worden gevormd (5) (Figuur 1). Onlangs is door Wolffenbuttel en medewerkers aangetoond dat hemoglobine-AGE een goede integraal is van de gemiddelde glucosespiegels gedurende de voorafgaande 7 tot 8 weken (6). Amadori-producten kunnen tevens worden afgebroken tot N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine en 3-deoxyglucosone. De intermediaire  $\alpha$ -dicarbonylverbindingen, 3-deoxyglucosone en methylglyoxaal, worden beschouwd als belangrijke tussenproducten in de vorming van AGE's. 3-Deoxyglucosone wordt hoofdzakelijk gevormd uit de degradatie van Amadori-producten en de belangrijkste route voor de vorming van methylglyoxaal is defosforylatie van de trioses glyceraldehyde-3-fosfaat en dihydroxyacetonfosfaat. Beide  $\alpha$ -dicarbonylverbindingen komen verhoogd voor in het bloed van diabetes patiënten (7,8). Als gevolg van het irreversibele karakter van de niet-enzymatische glycosylering hopen AGE's zich op. AGE's kunnen tevens met aminogroepen van andere eiwitten cross-links vormen. Gezien de vele mogelijke chemische reacties die kunnen leiden tot AGE's, zijn AGE's onder te brengen in een heterogene groep van glucose-adducten en cross-links. Tot op heden zijn slechts enkele AGE-producten geïdentificeerd, zoals pentosidine, pyraline en crosslines. Echter, deze AGE's weerspiegelen slechts een fractie van het totaal aan AGE's dat aanwezig is.

### Vóorkomen van AGE's

In patiënten met diabetes mellitus worden AGE's verhoogd gevonden in plasma en weefsels, zowel inter- als intracellulair. Recent vonden wij een verhoging van pentosidine in urines van patiënten met van insuline-afhankelijke diabetes mellitus t.o.v. een gezonde controlegroep (9) (Figuur 2). De spiegels van dit AGE-product namen met de leeftijd toe, ook bij niet-diabeten. Echter, de toename in de diabetesgroep was significant hoger dan in de controle groep. AGE's zijn in vivo aangetoond op een groot aantal eiwitten o.a. collageen (10), albumine (11) en plasma low density

Afdeling Centraal Chemisch Laboratorium<sup>1</sup> en Interne Geneeskunde<sup>2</sup>, Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit Amsterdam; Instituut voor Cardiovasculaire Research<sup>3</sup>, Vrije Universiteit Amsterdam; Gaubius Laboratorium TNO-PG, Leiden<sup>4</sup>

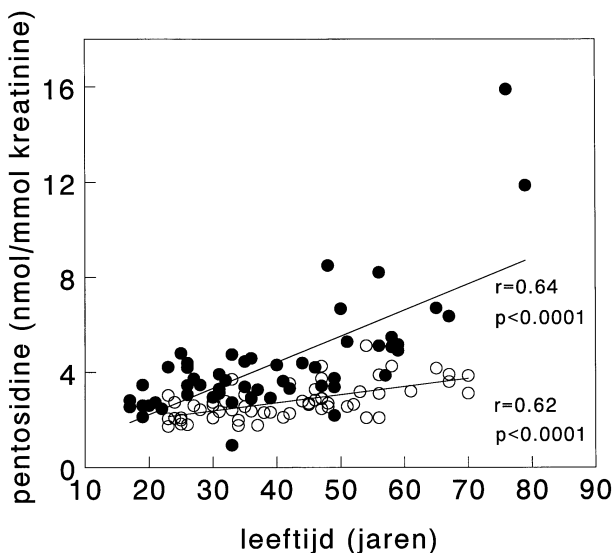
Correspondentie: Dr. C.G. Schalkwijk, Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit, Centraal Chemisch Laboratorium, Postbus 7057, 1007 MB Amsterdam.  
Email: C.Schalkwijk@AZVU.NL  
Ingekomen: 04.05.98



**Figuur 1.** Schematische weergave van de niet-enzymatische glyceringsreactie

lipoproteïnen (LDL) (12). Ook op erythrocyten van diabeten werden verhoogde AGE-concentraties gevonden (13). Intracellulair kunnen met name glucose-6-fosfaat en glyceraldehyde-3-fosfaat AGE's vormen en er is recent aangetoond dat basic fibroblast growth factor als gevolg van intracellulaire hoge glucose concentraties geglyceerd wordt (14). Bij de mens werden in arteriële specimina AGE's gevonden, met name in de atherosclerotische plaques (15). Behalve in de verdikte intima, werden zij ook aangetroffen in macrofagen en sommige endotheelcellen in de adventitia en diffuus verdeeld in de media (15,16). AGE's zijn verder aangetoond in o.a. zenuwen, nieren en retina's van diabeten (17-20).

AGE's worden niet alleen verhoogd gevonden bij diabeten. Ook tijdens veroudering ontstaan hogere AGE-spiegels. Verder is in verschillende studies aangetoond dat de AGE producten pentosidine en pyralline verhoogd voorkomen in hersenweefsels van patiënten met Alzheimer en dat ze correleren met de pathologie van het ziektebeeld (21,22). Recent is aangetoond dat AGE's opgenomen via voeding, een verhoging geeft van AGE's in het bloed (23). In diabeten met nierfalen leidt dit tot een extra verhoging van AGE's in het serum, wat een verhoogd risico geeft op verdere complicaties. Tevens is vastgesteld dat rokers verhoogde spiegels hebben van AGE's (24). Of deze toename verband houdt met het sterk verhoogde risico van rokers voor atherosclerose en kanker is niet bekend.



**Figuur 2.** Toename van pentosidine in urine van gezonde controles (○) en patiënten met van insuline-afhankelijke diabetes mellitus (●). Pentosidine is significant verhoogd in de diabeten groep ( $4,5 \pm 3,2$  (n=55) vs.  $2,8 \pm 0,7$  (n=60) nmol/mmol kreatinine,  $P < 0,001$ ). De toename van pentosidine met de leeftijd is zowel in de controle groep ( $r=0,62$ ,  $P < 0,0001$ ) als in de diabeten groep ( $r=0,64$ ,  $P < 0,0001$ ) significant. De toename in de diabeten groep is significant groter dan in de controle groep ( $P < 0,02$ )

### Pathofysiologische effecten van AGE's

Recente publicaties wijzen op een belangrijke rol van AGE's in het optreden van vasculaire complicaties bij diabetes patiënten, hoewel het mechanisme waarlangs dit gebeurt vooralsnog niet duidelijk is. Twee mogelijke mechanismen kunnen onderscheiden worden: a) verandering van eigenschappen van eiwitten en lipoproteïnen a.g.v. glycering en b) celactivatie door interacties van AGE's met specifieke receptoren.

#### Verandering van karakteristieken van geglyceerde eiwitten en lipoproteïnen

Glyceringen van enzymen kunnen leiden tot afname van activiteiten van deze eiwitten. Dit is aangetoond voor onder meer Na,K-ATPase (25) en Cu,Zn-superoxide dismutase (26). Met name verlagings van de activiteit van superoxide dismutase is in dit opzicht van belang, omdat het direct zou kunnen leiden tot een verhoging van oxidatieve stress bij diabetes. Daarnaast kunnen AGE's, maar ook Schiff-base en Amadori-producten, reactieve zuurstofradicalen genereren, dus een verhoging geven van de oxidatieve stress en mogelijk direct betrokken kunnen zijn bij het verloop van het ziektebeeld.

AGE-albumine induceert expressie van de extracellulaire matrix-eiwitten, zoals type IV collageen en laminine (27). Als gevolg van cross-linking van deze matrix-eiwitten leidt dit tot een verminderde afbraak van de matrix met als gevolg rigide structuren, verdikking van de basaalmembraan en verstarring van de vaatwand (28). Kort levende plasma eiwitten zoals LDL kunnen covalent binden aan deze AGE-adducten op extracellulaire matrixcomponenten (29). Heparansulfaatproteoglycanen tonen minder binding aan geglyceerde matrixcomponenten, met als gevolg een afname van de negatieve lading van de basaalmembraan (30) en mogelijk vaatlekkage in de nieren (albuminurie).

Tevens kan matrixaccumulatie van AGE's leiden tot een inactivatie van het stikstofoxide (NO) door AGE's. Er is gerapporteerd dat AGE-producten kunnen interfereren met de werking van de vasodilator NO (31). NO is een reactief radicaal dat in endotheelcellen door NO-synthase uit L-arginine gesynthetiseerd wordt. Het NO zorgt in gladde spiercellen voor een verhoging van cGMP en dientengevolge vaatwandverwijding. 'Quenching' van NO door AGE's zou dan direct tot een verstoorde vaatwandverwijding leiden.

AGE's hebben ook een effect op lipoproteïnen en met name op het LDL. Niet-enzymatische glycering van LDL leidt tot lipidenperoxidatieproducten (32,33). Als gevolg van een verminderde binding van AGE-LDL aan de LDL-receptor (34) en dientengevolge een verminderde klaring (35), worden hogere AGE-LDL spiegels gevonden bij diabeten (12,32). AGE-LDL wordt preferentieel opgenomen door scavengerreceptoren op macrofagen. Deze opname leidt tot cholesterolesterstapeling en tot de vorming van schuimcellen en atherosclerose (36). Hoewel ook belangrijke andere factoren, zoals bijvoorbeeld LDL-deeltjesgrootte en de anti-oxidatieve capaciteit van het serum, een belangrijke rol kunnen spelen bij het ontstaan van vasculaire complicaties, worden met name de oxidatieve modificatie van het AGE-LDL en de opname door macrofagen als belangrijke oorzaken gezien die kunnen leiden tot een drie- tot viervoudig verhoogd risico op het optreden van atherosclerose bij diabeten. Opgemerkt dient te worden dat tevens het disfunctioneren van het endotheel een belangrijke rol speelt bij het ontstaan van atherosclerose (37).

#### *Celactivatie door de interacties van AGE's met specifieke receptoren*

AGE's kunnen de structurele eigenschappen van eiwitten en lipoproteïnen veranderen, waardoor deze met name endotheelcellen en macrofagen kunnen activeren. Hierbij reageren zij met specifieke receptoren op deze cellen. Verschillende receptoren zijn beschreven: 60 en 90 kDa bindingseiwitten (38) en een receptor voor AGE's (RAGE) (39,40). Binding studies suggereren dat scavengerreceptoren eveneens een belangrijke rol spelen bij de interactie van AGE-eiwitten met endotheelcellen en macrofagen (41). Interactie van AGE-albumine met het vaatwandendotheel werd aangetoond in de rat en leidde in korte tijd tot de vorming van oxidatiemarkers in het endotheel (42). Immunolocalisatiestudies duiden op het vóór-

komen van RAGE op coronairendotheel van zowel gezonde als diabetische personen (43). Verhoogde RAGE-expressie werd gevonden op het endotheel bij patiënten met diabetes en met perifere vaatocclusie (44). AGE-proteïnen kunnen endotheelcellen activeren, waarbij waarschijnlijk reactieve zuurstofradicalen en activatie van NF- $\kappa$ B betrokken zijn. De effecten betreffen o.a. verhoging van de expressie van basaalmembraaneiwitten (45), tissue factor (46), VCAM-1 (47), monocyte chemotactic protein-1 en haem oxygenase (48), en verhoging van de permeabiliteit van de endotheelcellen (46,48). Deze bevindingen passen goed in een concept waarbij reactieve zuurstofintermediären betrokken zijn bij activering van NF- $\kappa$ B en genregulatie (49). In humane endotheelcellen is voorts aangetoond dat AGE's, via de binding aan RAGE, VCAM-1 induceren als gevolg van specifieke DNA-binding van NF- $\kappa$ B in de VCAM-1 promotor (47). VCAM-1 zorgt met name voor interactie van monocytten met het endotheel en de expressie van dit adhesie-eiwit is een belangrijke factor die kan bijdragen aan atherosclerose. Tevens is aangetoond dat AGE's angiogenese kunnen induceren middels de expressie van VEGF (50,51). Naast effecten op endotheelcellen kunnen ook andere vaatwandcellen, zoals pericyten en gladde spiercellen, door AGE's geactiveerd worden. Pericyten, geïncubeerd met AGE-albumine of gekweekt op niet-enzymatische geglycosyleerde basaalmembraaneiwitten, leidde tot een verminderde proliferatie en tot een verlies van het aantal pericyten (52,53). Dit effect wordt beschouwd als een belangrijk pathofysiologisch effect in het optreden van microvasculaire complicaties. Van AGE's is beschreven dat zij de transendotheliale migratie van monocytten stimuleren (54) en dat zij monocytten aanzetten tot het produceren van cytokinen en groeifactoren (55,56).

Volgens de nieuwste inzichten kunnen ook tussenproducten in de vorming van AGE's, zoals methylglyoxaal en 3-deoxyglucosone, betrokken zijn bij verschillende complicaties. Recent werd beschreven dat methylglyoxaal-gemodificeerd albumine specifiek bindt aan macrofagen en competeert met de binding van AGE-albumine (57,58). Methylglyoxaal-albumine induceert in monocytten de productie van cytokinen (59), analoog aan het effect van AGE's (55,56). Verder is er nog weinig bekend van de biologische effecten van 3-deoxyglucosone- en methylglyoxaal-adducten.

In de laatste jaren zijn verschillende experimenten beschreven, die een in vivo belang van AGE's ondersteunen. Injectie van AGE's leidt in proefdieren tot ophoping van AGE's in de basaalmembraan van de glomerulus, albuminurie (60), IL-6 mRNA expressie (13), oxidatieschade en een toename van de permeabiliteit van het endotheel (50) en tot VCAM-1 en ICAM-1 expressie en atheroma-vorming (49,61). Er is tevens gerapporteerd dat AGE-producten leiden tot een verstoorde vaatwandverwijding (31).

#### **Detectie van AGE's**

AGE's zijn een heterogene groep van complexe structuren. Het is van belang om precies te kunnen vaststellen welke AGE's of tussenproducten van de niet-

enzymatische glycosylering betrokken zijn in het niet goed functioneren van het endotheel en het optreden van complicaties om zodoende gericht te kunnen ingrijpen. Welke AGE-producten of AGE-intermediären correleren met verschillende vormen van vaatdisfunctioneren, zoals vóórkomen bij diabetes patiënten, is onbekend. Het is mogelijk dat verschillende AGE's betrokken zijn bij verschillende complicaties. Teneinde dit te kunnen onderzoeken zijn specifieke technieken nodig om deze producten te detecteren. Commerciële kits zijn niet beschikbaar en daarom is het detecteren van AGE's binnen de klinische chemie beperkt gebleven. AGE's werden in het verleden gemeten met een tijdrovende radioreceptor-assay (62). Met de beschikbaarheid van antilichamen is met een ELISA een verhoging van AGE's aangetoond in diabetes patiënten (63), en heeft men aangetoond dat AGE's correleren met de progressie van complicaties aan ogen en nier (64). Deze verhoging van AGE's ging zelfs vooraf aan morfologische veranderingen in de nier (65). In deze immuno(histo)chemische studies is gebruik gemaakt van een polyclonaal antilichaam, waarvan het herkenningsepitop vooral nog niet bekend is. Het is van belang dit vast te stellen, om aan te kunnen geven welke AGE's leiden tot vaatdisfunctioneren en vasculaire complicaties. In recente studies zijn pentosidine (66) en pyrraline (67) met specifieke antilichamen in een ELISA aangetoond, terwijl het zuurstabiele pentosidine tevens is gemeten met HPLC methoden, zowel in de vrije vorm in urine als ook na een zure hydrolyse van plasma-eiwitten en collageen (9,68). Recent konden wij aantonen dat pentosidine, gedetecteerd in de urine met behulp van een HPLC methode, correleert met de eiwitten van Willebrandfactor en sVCAM (9); eiwitten die het disfunctioneren van het endotheel weerspiegelen. Deze resultaten geven nogmaals het belang aan van niet-enzymatische glycosyleringsproducten, in dit geval pentosidine, in het disfunctioneren van de vaatwand. De belangrijke intermediären methylglyoxaal en 3-deoxyglucosone kunnen worden gemeten met HPLC en met GC-MS (7,8) en er zijn sterke indicaties dat met name het metabolisme van methylglyoxaal gekoppeld is aan complicaties bij diabetes (69). Dit laatste aspect verdient nader onderzoek.

AGE's vertonen een karakteristieke fluorescentie en recent is een fluorescentietechniek beschreven voor de detectie van AGE's in humaan serum (70). Het nadeel van deze methode is dat niet alle AGE's fluorescentie vertonen en daardoor wordt met deze methode slechts een onbekend gedeelte van alle AGE's gedetecteerd.

### Farmacologische interventie

De vorming van advanced glycation endproducts uit glucose en uit reactieve  $\alpha$ -dicarbonyl intermediären kan geremd worden door aminoguanidine. Dit hydrazine remt AGE-vorming, waarschijnlijk via een interactie met reactieve Amadori-(afbraak)producten. Het zorgt o.a. voor een vermindering van collageen-crosslinks (71) en een toename van de elasticiteit van arteriën (72) en een vermindering van de glomerulaire basaalmembranverdickning (73). Het remt de oxidatieve modificatie van AGE-LDL en de opname van

AGE-LDL door macrofagen (74). Het remt de proliferatie van endotheelcellen en het verlies van pericyten in de retina. In proefdieren remt aminoguanidine dan ook het optreden van nefropathie (75), neuropathie (76) en retinopathie (77).

Recent is N-phenacylthiazoliumbromide beschreven, dat in vitro en mogelijk ook in vivo vermindering geeft van AGE-cross-links. Er is aangetoond dat dit nieuwe type AGE-breker werkt middels het verbreken van de koolstof-koolstof-interactie van reactieve  $\alpha$ -dicarbonyl intermediären (78). Deze experimenten geven tevens het belang aan van  $\alpha$ -dicarbonyl intermediären in de vorming van cross-links. Met experimenten in proefdieren zal de waarde van deze nieuwe groep remmers bewezen moeten worden.

### Conclusie

Het niet goed functioneren van de endotheelcellen speelt een belangrijke rol bij het ontstaan van verschillende complicaties bij patiënten met diabetes mellitus. Er zijn duidelijke aanwijzingen dat AGE's betrokken zijn bij verschillende complicaties. Echter, om te kunnen vaststellen welke AGE-producten correleren met verschillende vormen van vaatdisfunctioneren en welke AGE's mogelijk een indicatie geven van toekomstig vaatlijden, zijn specifieke analytische technieken nodig om de verschillende AGE's te kunnen kwantificeren. Dit is essentieel om te komen tot een verbetering van de diagnostiek. Om meer inzicht te krijgen in het achterliggende mechanisme dat leidt tot AGE-geïnduceerd vaatlijden is verder celbiologisch onderzoek noodzakelijk. Een verbetering van de behandeling van vasculaire complicaties bij diabetes patiënten door te interfereren in het mechanisme waarmee AGE's vaatlijden induceren is hierbij het streven.

### Literatuur

1. King GL, Shiba T, Oliver J, Inoguchi J, Bursell SE. Cellular and molecular abnormalities in the vascular endothelium of diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 1994; 45: 179-188.
2. The Diabetes Control and Complication Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes in the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
3. Miedema K, Casparie T. Glycosylated haemoglobins: biochemical evaluation and clinical utility. *Ann Clin Biochem* 1984; 21: 2-15.
4. Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine, a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chem Acta* 1982; 127: 87-95.
5. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Biology of disease. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biological and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 1994; 70: 138-151.
6. Wolfenbutter BHR, Giordano D, Founds HW, Bucala R. Long-term assessment of glucose control by haemoglobin-AGE measurement. *Lancet* 1996; 346: 513-515.
7. McLellan AC, Phillips SA, Thornally PJ. The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene. *Anal Biochem* 1992; 206: 17-2.
8. Lal S, Kappler F, Walker M, Orchard TJ, Beisswenger PJ, Swerzgold BS, Brown TR. Quantitation of 3-deoxyglucosone levels in human plasma. *Arch Biochem Biophys* 1997; 342: 254-260.

9. Smulders RA, Stehouwer CDA, Schalkwijk CG, Donker AJM, van Hinsbergh VWM, Tekoppele JM. Distinct association of HbA1c and the urinary excretion of pentosidine, an advanced glycation end-product, with markers of endothelial function in insulin-dependent diabetes mellitus. *Throm Haem* 1998; in press.
10. Monnier VM, Kohn R, Cerami A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 583-587.
11. Day JF, Thorpe SR, Baynes J. Nonenzymatically glycosylation albumin *J Biol Chem* 1997; 254: 595-597.
12. Schleicher E, Deufel T, Wieland, OH. Non-enzymatic glycation of human serum lipoprotein. *Febs Lett* 1981; 129: 1-4.
13. Schmidt AM, Haus M, Popov JH, Zhang SD, Yan J, Brett R, Cao K, Kuwabara G, et al. The receptor for AGE's has a central role in vessel wall interaction and gene activation in response to AGEs in the intravascular space. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8807.
14. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. *J Clin Invest* 1994; 94: 110-117.
15. Kume S, Takeya M, Mori T, Araki N, Suzuki H, Horiuchi S, Kodama T, et al. Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol* 1995; 147: 654-667.
16. Nakamura Y, Horii Y, Nishino T, Shiiki H, Sakaguchi T, Kagoshima T, Dohi K, et al. Immunohistochemical localization of AGEs in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus. *Am J Pathol* 1993; 143: 1649-1655.
17. Sugimoto K, Nishizawa, Y, Horiuchi S, Yagihashi S. Localization in human diabetic peripheral nerve of N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine-protein adducts, an advanced glycation endproduct. *Diabetologia* 1997; 40: 1380-1387.
18. Yamada K, Miyahara Y, Hamaguchi K, Nakayama M, Nakano H, Nozaki O, Miura Y, et al. Immunohistochemical study of human advanced glycosylation end-products (AGE) in chronic renal failure. *Clin Neph* 1994; 42: 354-361.
19. Murata T, Nagai R, Ishibashi T, Inomata H, Ikeda K, Horiuchi S. The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. *Diabetologia* 1997; 40: 764-769.
20. Souliis T, Thallas V, Gilbert RE, McWilliam BG, Murray-McIntosh RP, Cooper ME. Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia* 1997; 40: 619-628.
21. Smith MA, Taneda S, Richey PL, Miyata S, Yan S-D, Stern D, Sayre LM, et al. Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5710-5714.
22. Yan S-D, Yan S-F, Chen X, Fu J, Chen M, Kuppusamy P, Smith MA, et al. Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidative stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid-β-peptide. *Nature Med* 1995; 1: 693-699.
23. Koschinsky T, He C-J, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 6474-6479.
24. Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, et al. Smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 13915-13920.
25. Garner MH, Bahador A, Sachs G. Nonenzymatic glycation of Na,K-ATPase: effect of ATP hydrolysis and K-occlusion. *J Biol Chem* 1990; 265: 15058-15066.
26. Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N. Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. Identification of the in vitro glycation sites. *J Biol Chem* 1987; 262: 16969-1697.
27. Yang C, Vlassara H, Peten EP, He C-J, Striker GE, Striker LJ. Advanced glycation endproducts up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9436-8840.
28. Fuh H, Yang D, Striker L, Striker G, Vlassara H. In vivo AGE-peptide injection induces kidney enlargement and glomerular hypertrophy in rabbits: prevention by amino-guanidine. *Diabetes* 1992; 41: 9.
29. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. *Diabetes* 1985; 34: 939-941.
30. Brownlee M. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 1994; 43: 836-841.
31. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991; 87: 432-438.
32. Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6434-6438.
33. Al-Abed Y, Liebich H, Voelter W, Bucala R. Hydroxylalkenal formation induced by advanced glycosylation of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1996; 271: 2892-2896.
34. Witztum JL, Mahoney, EM, Branks, MJ, Fisher M, Elam R, Steinberg D. Nonenzymatic glycosylation of low-density lipoprotein alters its biologic activity. *Diabetes* 1982; 31: 283-291.
35. Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Modification of LDL by advanced glycation endproducts contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9441-9445.
36. Lopes-Virella MF, Klein RL, Lyons TJ, Stevenson HC, Witztum JL. Glycosylation of low-density lipoprotein enhances cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages. *Diabetes* 1988; 37: 550-557.
37. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature* 1993; 362: 801-809.
38. Yang BZ, Makita Z, Horii Y, Brunelle S, Cerami A, Sehajpal P, Suthanthiran M, et al. Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosylation endproducts: relationship to macrophage receptor for glucose-modified protein. *J Exp Med* 1991; 174: 414-524.
39. Nepper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, et al. Cloning and expression of RAGE: a cell surface receptor for AGEs. *J Biol Chem* 1992; 267: 14998-15004.
40. Schmidt AM, Mora R, Cao R, Yan SD, Brett J, Ramakrishnan R, Tsang TC, et al. The endothelial cell binding site for AGE consists of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. *J Biol Chem* 1994; 269: 9882-9888.
41. Araki N, Higashi T, Mori T, Shibayama R, Kawabe Y, Kodama T, Takahashi K, et al. Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur J Biochem* 1995; 230: 408-415.
42. Yan S-D, Schmidt AM, Anderson M, Zhang J, Brett J, Zou D, Pinsky, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of AGE's with their receptor/binding protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 9889-9887.
43. Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, Capron L, et al. AGE's on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7742-7746.

44. Ritthaler U, Deng Y, Zhang Y, Greten J, Abel M, Sido B, Otto G, et al. Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease. *Am.J.Pathol.* 1995; 146: 688-694.
45. Yang CW, Vlassara H, Peten E P, He C-J, Striker G, Striker L. Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9436-9440.
46. Esposito C, Gerlach H, Brett J, Stern D, Vlassara H. Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* 1989; 170: 1387-1407.
47. Schmidt AM, Hori O, Chen J-X, Li J-F, Crandall J, Zhang J, Cao R, et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of VCAM-1 in cultured endothelial cells and in mice. *J Clin Invest* 1996; 96: 1595-1403.
48. Wautier J-L, Zoukourian C, Chappay O, Wautier, M-P, Guillausseau, P-J Cao R, Hori O, et al. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. *J Clin Invest* 1996; 97: 238-243.
49. Anderson MT, Staal FJ, Gitler C, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Separation of oxidant-initiated and redox regulated steps in the NF- $\kappa$ B signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11527-11531.
50. Tezuka M, Koyama N, Morisaki N, Saito Y, Yoshida S, Araki N, Horiuchi S. Angiogenic effects of advanced glycation end products of the Maillard reaction on cultured human umbilical cord vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193: 674-680.
51. Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, Ooka H, et al. Advanced glycation end products-driven angiogenesis in vitro. *J Biol Chem* 1997; 13: 8723-8730.
52. Chibber R, Molinatti PA, Rosatto N, Lambourne B, Kohner EM. Toxic action of advanced glycation end products on cultured retinal capillary pericytes and endothelial cells: relevance to diabetic retinopathy. *Diabetologia* 1997; 40: 156-164.
53. Kalfa TA, Gerritsen ME, Carlson EC, Binstock AJ, Tsilibary EC. Altered proliferation of retinal microvascular cells on glycated matrix. *Inves Ophth Vis Sci* 1995; 36: 2358-2367.
54. Kirstein M, Brett J, Radoff S, Ogawa S, Stern D, Vlassara H. AGE induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9010-9014.
55. Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A. TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodelling. *Science* 1988; 240: 1546-1548.
56. Kirstein M, Aston C, Hintz R, Vlassara H. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest* 1992; 90: 439-446.
57. Westwood ME, McLellan AC, Thornally PJ. Receptor-mediated endocytic uptake of methylglyoxal-modified serum albumin. *J Biol Chem* 1994; 269: 32293-32298.
58. Lo TWC, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornally P. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. *J Biol Chem* 1994; 269: 32299-32305.
59. Abordo EA, Thornalley PJ. Synthesis and secretion of tumour necrosis factor by human monocytic THP-1 cells and chemotaxis induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose-derived advanced glycation endproducts. *Immunol Lett* 1997; 58: 139-147.
60. Vlassara H, Striker L, Teichberg S, Fuh H, Li Y-M, Steffes M. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11704-11708.
61. Vlassara H, Fuh H, Donnelly T, Cybulsky M. Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Molecular Medicine* 1995; 447-456.
62. Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V et al. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Eng J Med* 1991; 325: 836-841.
63. Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bucala R. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J Biol Chem* 1992; 267: 5133-5138.
64. Beisswenger PJ, Makita Z, Curphey TJ, Moore L, Jean S, Brinck-Johnsen T, Bucala R, et al. Formation of immunochemical advanced glycosylation endproducts precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes* 1995; 44: 824-829.
65. Berg TJ, Bangstad HJ, Torjesen PA, Osterby R, Bucala R, Hanssen KF. Advanced glycation end products in serum predicts changes in the kidney morphology of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1997; 6: 661-665.
66. Tameda S, Monnier VM. ELISA of pentosidine, an advanced glycation end product, in biological specimens. *Clin Chem* 1994; 40: 1766-1773.
67. Miyata S, Monnier VM. Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrrolidine. *J Clin Invest* 1992; 89: 1102-1112.
68. Sell DR, Lapolla A, Odetti, P, Fogarty J, Monnier VM. Pentosidine formation in skin correlates with severity of complications in individuals with long-standing IDDM. *Diabetes* 1992; 41: 1286-1292.
69. McMellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonkesen, PH. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci* 1994; 87: 21-29.
70. Wróbel K, Wróbel K, Garay-Sevilla ME, Nava LE, Malacara JM. Novel analytical approach to monitoring advanced glycosylation end products in human serum with on-line spectrophotometric and spectrofluorometric detection in a flow system. *Clin Chem* 1997; 43: 1563-1569.
71. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 1986;232:1629-1632.
72. Huijberts, MSP, Wolffenbuttel BHR, Struijker Boudier HAJ, Crijns FRL, Niewenhuijzen, Kruseman AC, Poitevin P, Levy BI. Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J Clin Invest* 1993; 92: 1407-1411.
73. Ellis EN, Good BH. Prevention of glomerular basement membrane thickening by aminoguanidine in experimental diabetes mellitus. *Metabolism* 1991; 40: 1016-1019.
74. Picard S, Parthasarathy S, Fruebis J, Witztum J. Aminoguanidine inhibits oxidative modification of low density lipoprotein and the subsequent increase in uptake by macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6876-688.
75. Soulis T, Cooper ME, Vranes D, Bucala R, Jerums G. Effects of aminoguanidine in preventing experimental diabetic nephropathy are related to the duration of treatment. *Kidney Int* 1996; 50: 627-34.
76. Hammes H, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11555-11558.
77. Cameron NE, Cotter MA, Dines K, Love A. Effects of aminoguanidine on peripheral nerve function and polyol pathway metabolites in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1992; 35: 946-950.
78. Vasan S, Zhang X, Zhang X, Kapurniotu A, Bernhagen J, Teichberg S, Basgen J, et al. An agent cleaving glucose-derived protein cross-links in vitro and in vivo. *Nature* 1996; 382: 275-278.