

Efecto de diferentes agentes químicos en la formación de Nε-carboximetil-lisina utilizando el ácido glioxílico, un metabolito universal asociado con el desarrollo y progreso de la diabetes

Effect of different chemical agents on the formation of Nε-carboxymethyl-lysine using glyoxylic acid a universal metabolite associated with the development and progression of diabetes

Sarahí Jaramillo Ortiz*, Kazimierz Wrobel*, Alma Rosa Corrales Escobosa*, Katarzyna Wrobel*

RESUMEN

Se presenta un estudio del efecto de diferentes tioles y iones metálicos en la formación de Nε-carboximetil-lisina (CML), utilizando el ácido glioxílico como agente glicante y la N(2)-benciloxicarbonil-L-lisina (Z-lys-OH) o albúmina de suero humano como blancos de glicación. Se ha confirmado, mediante el análisis cromatográfico, la formación de Z-CML en cada una de las mezclas, y se observó que los tioles inhiben la reacción en el orden: HCys>LCys>GSH>ACys. El efecto inhibitorio se detectó también en presencia de Zn(II), mientras que para Cu(II) los resultados no fueron concluyentes. La adición simultánea de acetilcisteína (ACys) o glutatión (GSH) y Zn(II) resultó en un aumento del efecto inhibitorio observado para cada uno de ellos por separado. Estos resultados sugieren un nuevo mecanismo de acción de tioles en el contexto de la formación de los productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés).

ABSTRACT

This study focuses on different metal ions and thiols potentially affecting the formation of Nε-carboxymethyl-lysine (CML), when using glyoxylic acid as glycation agent and Z-Lys-OH or human serum albumin as glycation targets. It was confirmed by chromatographic analysis that Z-CML was generated in all mixtures and that thiols acted as the reaction inhibitors in the following order: HCys> LCys> GSH> ACys. The inhibitory effect was also detected in the presence of Zn(II), whereas for Cu(II) results were inconclusive. When Acys or GSH and Zn(II) were added simultaneously, the decrease of CML formation was more pronounced as compared to the inhibitory effects observed separately for each compound. The results obtained suggest a novel mechanism of thiols action within the context of Advanced Glycation end-product (AGEs) formation.

INTRODUCCIÓN

El ácido glioxílico (AG) es un metabolito producido prácticamente en todos los organismos vivos en rutas variables, pero similares entre diferentes especies. La síntesis y catabolismo del AG ocurre a través de procesos enzimáticos dentro de las vías de glicólisis, gluconeogénesis, ciclo de glioxilato (variante del ciclo Krebs), degradación de purinas, metabolismo de lípidos, en la transformación de glicina y de otros aminoácidos (Davis & Goodman, 1992; De Figueiredo, Schuster, Kaleta & Fell, 2009; Kunze, Pracharenwattana, Smith & Hartig, 2006; Sakuraba, Fujiwara & Noguchi, 1996). En humanos, el AG se genera principalmente mediante la oxidación enzimática del glicolato en peroxisomas (glicolato oxidasa), a partir de glicina por acción de D-aminoácido oxidasa en riñones, como producto de degradación mitocondrial de 4-hidroxi prolina derivada del consumo de carne o de la degradación endógena del colágeno y también como producto de la destoxificación enzimática de glioxal. Dicha destoxificación puede ocurrir mediante el sistema de glioxalasa formando glicolato que posteriormente es oxidado por glicolato oxidasa; alternativamente, glioxal puede oxidarse a AG con ayuda de aldehído deshidrogenasa (Holmes, 2000; Masters, 1997).

Recibido: 8 de abril de 2015
Aceptado: 18 de mayo de 2015

Palabras clave:

Productos finales de glicación avanzada; ácido glioxílico; tioles; iones metálicos.

Keywords:

Advanced glycation end products; glyoxylic acid; thiols; metal ions.

Cómo citar:

Jaramillo Ortiz, S., Wrobel, K., Corrales Escobosa, A. R. & Wrobel, K. (2015). Efecto de diferentes agentes químicos en la formación de Nε-carboximetil-lisina utilizando el ácido glioxílico, un metabolito universal asociado con el desarrollo y progreso de la diabetes. *Acta Universitaria*, 25(NE-1), 14-18. doi: 10.15174/au.2015.752

* Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. Lascuráin de Retana núm. 5, Guanajuato, Guanajuato, México, C.P. 36000. Tel.: (473) 7327555. Correo electrónico: katarzyn@ugto.mx

A pesar de la variedad de las rutas de su formación, las concentraciones fisiológicas de AG permanecen relativamente bajas (del orden de 25 μM en plasma sanguínea de adultos sanos (Henning, Liehr, Girndt, Ulrich & Glomb, 2014; Nikiforova *et al.*, 2014), lo cual es debido a su rápida oxidación a oxalato catalizada por una lactato deshidrogenasa, por su re-conversión en glicina mediante la acción de alanina-glioxilato aminotransferasa (AGT2) (principalmente en peroxisomas del hígado), o su reducción a glicolato por acción de glioxilato reductasa en citosol (Wanders, 2014). El AG, junto con el oxalato, es eliminado del organismo por la orina. La deficiencia de los sistemas enzimáticos y cambios de los niveles de AG han sido asociados con diferentes tipos de patologías. Como ejemplo, la sobreproducción de oxalato que predispone a hiperocalurias es el resultado del aumento de la oxidación de glicolato y/o del metabolismo de 4-hidroxi prolina (Coulter-Mackie, 2006; Murray, Holmes & Lowther, 2008). Por otro lado, se ha propuesto que el ciclo de glioxilato podría ser involucrado en el desorden metabólico en humanos debido a su capacidad de conversión de ácidos grasos en glucosa (Song, 2000). Se ha sugerido también la relación entre el aumento del AG y la hipertensión; tal como ya se mencionó, el AG es sustrato de la enzima AGT2, la cual es crucial para mantener los niveles adecuados de óxido nítrico (NO); uno de los factores en hipertensión es disminución de la actividad de AGT2 que al mismo tiempo provoca un aumento de AG (Caplin *et al.*, 2012; Padberg *et al.*, 2014). Finalmente, el AG es un potente agente glicante catalogado como precursor de los productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés); en particular, se estimó que el AG presenta hasta 60% mayor reactividad con albúmina con respecto a glucosa (Dutta, Cohenford, Guha & Dain, 2007). Un estudio reciente demuestra que los niveles plasmáticos del AG son aumentados en las etapas tempranas de la diabetes e incluso en las etapas de prediabetes, por lo que se propuso al AG como uno de los metabolitos de la huella patofisiológica de la diabetes y un biomarcador temprano de esta enfermedad (Padberg *et al.*, 2014).

En estudios sobre AGEs, el AG ha sido utilizado principalmente para lograr modificación de proteínas y/o para sintetizar N ϵ -carboximetil-lisina (CML) de manera eficaz, evitando prolongados tiempos de incubación (Buetler *et al.*, 2008; Dvorakova, Prouza, Janouskova, Panigaj & Holanda, 2011). Típicamente, se lleva a cabo la incubación de lisina protegida químicamente en el nitrógeno a (para simular su incorporación en la cadena peptídica) o albúmina (u otras proteínas) con el AG, agregando cianoborohidruro de sodio para facilitar la reducción de la base de Schiff y manteniendo temperatura elevada (80 °C) y el pH neutro (tampón de

fosfatos pH 7.4); en estas condiciones la modificación ocurre en unas pocas horas (semanas en el caso de glucosa). Por otro lado, en 98 los estudios centrados en la caracterización de la modificación de proteínas, el uso del ácido glioxílico ha sido mucho menos común respecto a otros agentes glicantes, tales como glucosa, metilglioxal y glioxal.

Debido a la importancia del ácido glioxílico como un metabolito universal, y por su asociación con la diabetes, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar cómo se ve afectada la formación de CML a partir de AG en presencia de varios agentes químicos, potencialmente presentes en las condiciones fisiológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las mezclas de reacción para el estudio del efecto de tioles se prepararon en tubos eppendorf, a 100 μL de la solución de Z-lisina-OH (500 nmol) se agregó una alícuota de la solución de uno de los tioles (500 nmol de acetilcisteína [ACys]; L-cisteína [LCys]; homocisteína [HCys] o glutatión [GSH]), 150 μL de la solución AG (750 nmoles) y se completó el volumen a 800 μL con ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-etanosulfónico (HEPES) 25 mM, pH 7.4. Después de la incubación (80 °C, 4 h), se agregaron 200 μL de cianoborohidruro de sodio 5 mM, se centrifugaron las mezclas, se diluyeron 2:1 con la fase móvil y se inyectaron al sistema cromatográfico. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos modelo 1200 de Agilent Technologies con detector espectrofotométrico y la columna Luna C8 (250 mm \times 3 mm, 5 μm); la separación se obtuvo con fases móviles de formiato de amonio (pH 6.4) y gradiente de acetonitrilo. Se recolectaron las fracciones de la columna para la caracterización estructural de los compuestos por espectrometría de masas de alta resolución (maxis Impact ESI-QTOFMS, Bruker).

Para examinar el efecto de iones metálicos sobre la formación de CML en este sistema, se modificaron las mezclas de reacción de tal manera que antes de la incubación se agregaron alícuotas de las soluciones de Zn(II) o Cu(II) correspondientes a 1 nmol, 10 nmol, 50 nmol y 100 nmol de metal. También se prepararon muestras que contenían iones metálicos, pero sin tioles; siempre se llevó a cabo control del blanco (Z-lys-OH+AG+tampón+NaBH₃CN y Z-lys+tampón+NaBH₃CN).

Para fines comparativos, se llevaron a cabo experimentos muy similares, pero se utilizó albúmina de suero humano (HSA), glucosa como agente glicante, tampón HEPES, incubación a 37 °C durante 7 días en presencia de azida de sodio como reductor. La modificación de HSA en cada una de las mezclas de reacción

se midió mediante el procedimiento del análisis por inyección en flujo con detectores espectrofotométrico de arreglo de diodos (DAD) y fluorimétrico conectados en serie (Wrobel, Wrobel, Garay-Sevilla, Nava & Malacara, 1997).

RESULTADOS

Se analizaron dos tipos de mezclas de reacción: (1) en la que se sintetizó Z-lys-OH y AG utilizando NaBH_3CN como reductor y tampón de fosfatos durante 4 h y (2) en la que se modificó HSA por incubación larga (7 días) con glucosa en presencia de azida de sodio y tampón HEPES. En ambos sistemas se examinó el efecto de cuatro compuestos tipo tiol (ACys, LCys, HCys, GSH), de dos iones metálicos (Cu(II) y Zn(II)) y de las mezclas de tioles y iones metálicos, sobre la progresión de proceso de la glicación. Se varió la concentración de cada uno de los agentes químicos, manteniendo constante la cantidad de Z-Lys-OH(HSA) y AG (glucosa).

En primer lugar, mediante el análisis cromatográfico y mediante espectrometría de masas se confirmó la formación de CML en el sistema (1). Se ha observado que la presencia de tioles inhibió la formación de CML en el siguiente orden decreciente $\text{LCys} > \text{HCys} > \text{GSH} > \text{ACys}$. En mezclas conteniendo Zn(II) sin tioles también fue notoria la disminución en la formación de CML, el efecto se aumentó con creciente concentra-

ción del ión metálico; para el caso de Cu(II), su baja concentración parecía estimular la formación de AGEs, pero al aumentar la concentración el efecto desapareció. Los resultados obtenidos en las mezclas del sistema (1) que contenían tioles y iones metálicos se presentan en la figura 1, donde se confirma claramente que la presencia de tioles sin adición de iones metálicos provocó una disminución de formación de CML. En las mismas mezclas con adición de iones Zn(II) se observó un efecto inhibitorio muy claro de la reacción de Maillard entre Z-Lys-OH y AG. Para el caso de mezclas con presencia de tioles y el ion metálico cobre a diferentes concentraciones, el efecto fue menos claro. En concreto, después de la adición de Cu(II) a las mezclas con HCys y LCys, la conversión de Z-lys a Z-CML disminuyó; pero para las mezclas con GSH y ACys la señal de CML aumentó para todas las concentraciones de Cu(II). Por otro lado, en el caso de Zn(II) se ejerce un efecto sinérgico en la inhibición de la síntesis de CML muy pronunciado cuando se encuentra ACys en el medio de reacción. Con los demás tioles empleados (GSH, HCys y LCys), el efecto resulta menos evidente, pues el porcentaje de formación de Z-CML se mantiene y sólo disminuye considerablemente cuando la concentración de iones Zn(II) es baja (10 nmol).

Los resultados del análisis de la modificación de HSA (sistema 2), llevado a cabo por el método fluorimétrico, confirmaron de manera general tendencias observadas en la figura 1.

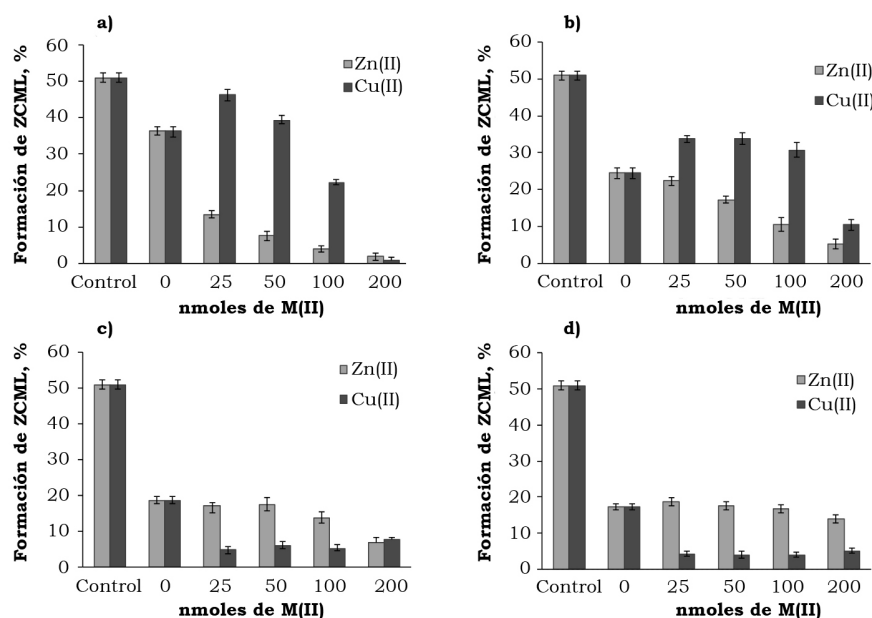


Figura 1. Efecto de los iones metálicos Zn(II) y Cu(II) en la inhibición de la formación de Z-CML por compuestos de tipo tiol: a) ACys, b) GSH, c) HCys y d) LCys. Fuente: Elaboración propia.

DISCUSIÓN

El ácido glioxílico (AG) es un metabolito formado en diferentes rutas y, al mismo tiempo, es un potente agente glicante. Recientemente se ha propuesto incluir este compuesto entre los metabolitos de la huella patofisiológica de la diabetes (Padberg *et al.*, 2014). Por otra parte, diferentes compuestos que contienen en su estructura el grupo sulfhidrilo (-SH) están en uso como agentes terapéuticos con propiedades antioxidantes, que ayudan a reducir el estrés oxidativo, inhibir la autooxidación de glucosa, y de esta manera protegen el organismo contra la formación excesiva de los precursores e intermediarios de los AGEs (Furfaro *et al.*, 2005; Michailidis *et al.*, 2013). Cabe también señalar que se reconoce la importancia de iones de metales de transición en el desarrollo y/o progresión de la diabetes (Rodríguez-Flores, Preciado-Puga, Wrobel, Garay-Sevilla & Wrobel, 2011). Con base en estos reportes anteriores, el presente trabajo se enfocó en el estudio de la síntesis de CML *in vitro* utilizando el AG y diferentes compuestos tipo tiol como posibles inhibidores de dicha reacción. En primer lugar, se estableció un procedimiento analítico que permite seguir cambios de concentración de sustratos (AG, Z-lys-OH) y de producto (Z-CML) durante la reacción de glicación de lisina. En el caso de glicación de HSA, para observar la modificación de proteína se adoptó el procedimiento previamente desarrollado (Wrobel *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos en los dos sistemas demostraron que los tioles actúan como inhibidores de glicación por AG, pero el efecto fue diferente para cada uno de los compuestos examinados (HCys>LCys>GSH>ACys). Es valioso mencionar que en un estudio similar, otros autores observaron el efecto contrario (favorable) de tioles en la síntesis de CML (Schwarzenbolz, Mende & Henle 2008; Schwarzenbolz & Henle, 2009). En los trabajos citados, sin embargo, se utilizó el glioxal, mientras que en el presente estudio el agente glicante fue el ácido glioxílico, lo que sugiere que el efecto del grupo tiol podría ser diferente dependiendo de la estructura del agente glicante.

En cuanto al efecto de iones metálicos, el Zn(II) causó una disminución en la formación de Z-CML, y además potencializó el efecto inhibidor de ACys y GSH. La importancia de Zn(II) en la diabetes ha sido estudiada extensivamente, y nuestros resultados agregan una nueva evidencia de sus efectos benéficos (Jayawardena *et al.*, 2012; Sarmiento, Silva, Sbruzzi, Schaan & Almeida, 2013). Por su parte, el aumento de concentración de cobre libre en el ambiente celular ha sido asociado con diferentes enfermedades crónicas degenerativas, incluyendo diabetes (Cooper, 2012; Tanaka *et al.*, 2009). En este estudio, aplicando la combinación de Cu(II) con

HCys o LCys, la síntesis de Z-CML se vio claramente disminuida, lo que sugiere un posible nuevo mecanismo de protección antioxidante de estos dos tioles.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las condiciones de reacción empleadas en el sistema (1) son adecuadas para estudiar efecto de diferentes agentes químicos sobre la reacción de glicación. De manera general, las tendencias de cambios observados en sistemas (1) y (2) fueron similares, pero los resultados cuantitativos presentaban ciertas diferencias, lo que podría adscribirse a diferente reactividad del ácido glioxílico con respecto a glucosa.

En las mezclas de reacción con Zn(II) y sin tioles se observó inhibición de la formación de CML, mientras que para el ión Cu(II) los resultados no fueron concluyentes. Por su parte, la presencia de tioles en esta misma mezcla de reacción presentó un efecto atenuador de los cambios provocados por el ion Cu(II). En el caso de Zn(II), este ión evidentemente potencializó el efecto inhibidor de tioles (en especial ACys) en la síntesis de Z-CML. Estos resultados son muy prometedores, ya que sugieren un nuevo mecanismo de acción benéfica de tioles en el contexto de la formación de los AGEs.

En relación con el recientemente propuesto papel de AG como biomarcador temprano de la diabetes, es interesante seguir con el estudio de las reacciones de glicación con participación de este compuesto y entender mejor el rol de los compuestos conocidos como inhibidores de los AGEs y de los iones de metales de transición.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), otorgado mediante el proyecto CB-2012-01-178553.

REFERENCIAS

- Buetler, T. M., Leclerc, E., Bauenmeyer, E., Latado, H., Newell, J., Adolfsson, O., Parisod, V., Richoz, J., Maurer, S., Foata, F., Piquet, D., Junod, S., Heizmann, C. W. & Delatour, C. (2008). Ne-carboxymethyllysine-modified proteins are unable to bind RAGE and activate an inflammatory response. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(3), 370-378.
- Caplin, B., Wang, Z., Slaviero, A., Tomlinson, J., Dowsett, L., Delahaye, M., Salama, A., Wheeler, D. C. & Leiper, J. (2012). Alanine-glyoxylate aminotransferase-2 metabolizes endogenous methylarginines, regulates NO, and controls blood pressure. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 32(12), 2892-2900.

- Cooper, G. J. (2012). Selective divalent copper chelation for the treatment of diabetes mellitus. *Current Medicinal Chemistry*, 19(17), 2828-2860.
- Coulter-Mackie, M. B. (2006). 4-Hydroxyproline metabolism and glyoxylate production: A target for substrate depletion in primary hyperoxaluria? *Kidney International*, 70(11), 1891-1893.
- Davis, W. L. & Goodman, D. B. (1992). Evidence for the glyoxylate cycle in human liver. *Anatomical Record*, 234(4), 461-468.
- De Figueiredo, L. F., Schuster, S., Kaleta, C. & Fell, D. A. (2009). Can sugars be produced from fatty acids? A test case for pathway analysis tools. *Bioinformatics*, 25(1), 152-158.
- Dutta, U., Cohenford, M. A., Guha, M. & Dain, J. A. (2007). Non-enzymatic interactions of glyoxylate with lysine, arginine, and glucosamine: a study of advanced non-enzymatic glycation like compounds. *Bioorganic Chemistry*, 35(1), 11-24.
- Dvorakova, E., Prouza, M., Janouskova, O., Panigaj, M. & Holanda, K. (2011). Development of monoclonal antibodies specific for glycated proteins. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 74(22-24), 1469-1475.
- Furfaro, A. L., Menini, S., Patriarca, S., Pesce, C., Odetti, P., Cottalasso, D., Marinari, U. M., Pronzato, M. A. & Traverso, N. (2005). HNE-dependent molecular damage in diabetic nephropathy and its possible prevention by N-acetylcysteine and olerutin. *BioFactors*, 24(1-4), 291-298.
- Henning, C., Liehr, K., Girdt, M., Ulrich, C. & Glomb, M. A. (2014). Extending the spectrum of alpha-dicarbonyl compounds *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(41), 28676-28688.
- Holmes, R. P. (2000). Oxalate synthesis in humans: assumptions, problems, and unresolved issues. *Molecular Urology*, 4(4), 329-332.
- Jayawardena, R., Ranasinghe, P., Galappathay, P., Malkanthi, R., Constantine, G. & Katulanda, P. (2012). Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 4(1), 13.
- Kunze, M., Pracharoenwattana, I., Smith, S. M. & Hartig, A. (2006). A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(12), 1441-1452.
- Masters, C. (1997). Gluconeogenesis and the peroxisome. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 166(1-2), 159-168.
- Michailidis, Y., Karagounis, L. G., Terzis, G., Jamurtas, A. Z., Spengos, K., Tsoukas, D., Chatziniolaou, A., Mandalidis, D., Stefanetti, R. J., Papassotiriou, I., Athanasopoulos, S., Hawley, J. A., Russell, A. P. & Fatouros, I. G. (2013). Thiol-based antioxidant supplementation alters human skeletal muscle signaling and attenuates its inflammatory response and recovery after intense eccentric exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(1), 233-245.
- Murray, M. S., Holmes, R. P. & Lowther, W. T. (2008). Active site and loop 4 movements within human glycolate oxidase: implications for substrate specificity and drug design. *Biochemistry*, 47(8), 2439-2449.
- Nikiforova, V. J., Giesbertz, P., Wiemer, J., Bethan, B., Looser, R., Liebenberg, V., Ruiz Noppinger, P., Daniel, H. & Rein, D. (2014). Glyoxylate, a new marker metabolite of type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Research*, 2014, Article ID 685204.
- Padberg, I., Peter, E., González-Maldonado, S., Witt, H., Mueller, M., Weis, T., Bethan, B., Liebenberg, V., Wiemer, J., Katus, H.A., Rein, D. & Schatz, P. (2014). A new metabolic signature in type-2 diabetes mellitus and its pathophysiology. *PLoS One*, 9, e85082.
- Rodríguez-Flores, C., Preciado-Puga, M., Wrobel, K., Garay-Sevilla, M. E. & Wrobel, K. (2011). Trace element status in diabetes mellitus 2: Possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 91(3), 333-341.
- Sakuraba, H., Fujiwara, S. & Noguchi, T. (1996). Metabolism of glyoxylate, the end product of purin degradation, in liver peroxisomes of fresh water fish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 229(2), 603-606.
- Sarmiento, R. A., Silva, F. M., Sbruzzi, G., Schaan, B. D. & Almeida, J. C. (2013). Antioxidant micronutrients and cardiovascular risk in patients with diabetes: a systematic review. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 101(3), 240-248.
- Schwarzenbolz, U., Mende, S. & Henle, T. (2008). Model studies on protein glycation: influence of cysteine on the reactivity of arginine and lysine residues toward glyoxal. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126, 248-252. doi: 10.1196/annals.1433.021
- Schwarzenbolz, U. & Henle, T. (2009). Cysteine Mediated Formation of N-ε-Carboxymethyllysine (CML) on Proteins. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(6), 156-159.
- Song, S. (2000). Can the glyoxylate pathway contribute to fat-induced hepatic insulin resistance? *Med Hypotheses*, 54(5), 739-747.
- Tanaka, A., Kaneto, H., Miyatsuka, T., Yamamoto, K., Yoshiuchi, K., Yamasaki, Y., Shimomura, I., Matsuoka, T. A. & Matsuhsa, M. (2009). Role of copper ion in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrine Journal*, 56(5), 699-706.
- Wanders, R. J. (2014) Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie*, 98, 36-44.
- Wrobel, K., Wrobel, K., Garay-Sevilla, M. E., Nava, L. E. & Malacara, J. M. (1997). Novel analytical approach to monitoring advanced glycosylation end products in human serum with on-line spectrophotometric and spectrofluorometric detection in a flow system. *Clinical Chemistry*, 43(9), 1563-1569.