

Original article

Protein cross-linking inhibition effects induced by glycative stress of black galangal, *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker (Zingiberaceae)

Masayuki Yagi, Kayoko Inoue, Yasuo Sato, Chieko Sakiyama, Yoshikazu Yonei

- 1) Anti-Aging Medical Research Center and Glycative Stress Research Center,
Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan.
- 2) Rene Co. Ltd., Osaka, Japan

Glycative Stress Research 2023; 10 (4): 171-176
(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

黒ガリンガルによる糖化蛋白の架橋抑制作用八木雅之¹⁾、井上佳如子²⁾、佐藤恭男²⁾、崎山智恵子¹⁾、米井嘉一¹⁾

- 1) 同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター／糖化ストレス研究センター
- 2) 株式会社レーネ

抄録

糖化ストレスによる終末糖化産物 (advanced glycation endproducts; AGEs) の生体内蓄積は、蛋白の架橋形成による組織硬化や生理的機能低下につながり、老化や生活習慣病の進展要因の一つとなる。糖化ストレスの抑制には食後高血糖の抑制、糖化反応の抑制、AGEsの分解排泄などがある。蛍光性AGEsには架橋性と非架橋性のAGEsが含まれ、蛍光性AGEs生成抑制作用は、さまざまな植物素材において報告されている。ショウガ科植物である黒ガリンガル (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker; KP) もその一つで、この作用には親水性成分やポリメトキシフラボノイド (polymethoxy flavonoid; PMF) が関与している。一方糖化蛋白の架橋構造にはいくつかの種類があり、 α ジケトン (α diketone) もその一つである。 α ジケトンの切断作用はAGEs架橋切断作用と呼ばれ、フェニルプロパジオン (1-phenyl-1,2-propanedione; PPD) が架橋モデル物質として使用され、遊離安息香酸の生成率からAGEs架橋切断率が評価されている。KPの根茎もAGEs架橋切断作用が報告されている。これまで糖化による蛋白架橋に対するAGEs生成抑制作用、AGEs架橋切断作用の影響を検証した報告は僅かである。本研究では蛍光性AGEs生成抑制作用とAGEs架橋切断作用を有するKP抽出液の糖化蛋白の架橋形成抑制作用 (inhibition of glycated-protein cross-linking; IGPC) と糖化蛋白架橋切断作用 (cleavage of glycated-protein cross-linking; CGPC) を検証した。

連絡先：客員教授 八木雅之
同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター／
糖化ストレス研究センター
〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3
TEL & FAX : 0774-65-6394 e-mail: myagi@mail.doshisha.ac.jp
共著者：井上佳如子 tmkayoko@miracle.ocn.ne.jp; 佐藤恭男 ceo.gran@gmail.com;
崎山智恵子 csakiyam@mail.doshisha.ac.jp; 米井嘉一 yyonei@mail.doshisha.ac.jp

Glycative Stress Research 2023; 10 (4): 171-176
本論文を引用する際はこちらを引用してください。
(c) Society for Glycative Stress Research

KEY WORDS: AGEs生成抑制、AGEs架橋切断、糖化蛋白架橋形成抑制、糖化蛋白架橋切断

はじめに

糖化ストレスによる終末糖化産物 (advanced glycation endproducts; AGEs) の生体内蓄積は蛋白の架橋形成による組織硬化や生理的機能低下に繋がり、老化や生活習慣病の進展要因のひとつとなる。体の糖化ストレス抑制は抗糖化や糖化ケアと呼ばれ、食後高血糖の抑制、糖化反応の抑制、AGEsの分解排泄などがある^{1,2)}。糖化反応抑制作用の指標の一つである蛍光性AGEs生成抑制作用が野菜やハーブなどさまざまな植物素材において既に報告されている^{3,4)}。この作用はショウガ科植物 (Zingiberaceae) の一種である黒ガリンガル (black galangal; *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker; KP) にも認められ^{5,6)}、ポリメトキシフラボノイド (polymethoxy flavonoid; PMF) や親水性成分の関与が報告されている⁷⁾。蛍光性AGEsには非架橋性のアルグピリミジン (argpyrimidine)、架橋性のベスパリジン (vesperlysin)、クロスリン (crossline) など様々な物質がある⁸⁾。

AGEs分解作用の指標の一つとして糖化蛋白の架橋構造の一種である α ジケトンの切断作用が評価される^{9,10,11)}。この作用はAGEs架橋切断作用と呼ばれる。AGEs架橋切断作用の評価にはフェニルプロパンジオン (1-phenyl-1,2-propanedione; PPD) が架橋モデル物質として用いられ、被験物質によって α ジケトンが切断されて遊離する安息香酸の生成率からAGEs架橋切断率が算出される。

AGEs架橋切断作用を有する物質には*N*-フェナシルチアゾリウムブロミド (*N*-phenacylthiazolium bromide; PTB)⁹⁾、ロスマリン酸 (rosmarinic acid)¹²⁾、エラジタンニン類 (ellagitannin)¹⁰⁾、フラボノイド (flavonoid)¹¹⁾ が報告されている。KPの根茎にもこの作用が報告されている¹³⁾。

一方、AGEs生成抑制作用を有する成分の蛋白架橋形成抑制作用、並びにAGEs架橋切断作用を有する成分の糖化蛋白の架橋切断作用に対する影響を検証した報告は僅かである^{14,15)}。

本研究では蛍光性AGEs生成抑制作用、AGEs架橋切断作用を有するKPが糖化による蛋白の架橋形成に及ぼす影響を評価することを目的に、糖化蛋白架橋形成抑制作用 (inhibition of glycated-protein cross-linking; IGPC)、糖化蛋白架橋切断作用 (cleavage of glycated-protein cross-linking; CGPC) を検証した。

方法

1) 試薬

使用した試薬は以下のメーカーから購入して使用した。*N*-フェナシルチアゾリウムブロミド (*N*-phenacylthiazolium bromide; PTB) はSigma-Aldrich Japan (東京都目黒区)。リゾチーム塩酸塩 (卵白由来)、アミノグアニジン (aminoguanidine hydrochloride; AG) は富士フィルム和光純薬工業 (大阪市)。4-20% Mini-Protean TGX Precast gel はBio-Rad (Hercules, California, USA)。その他の試薬は特級のを富士フィルム和光純薬工業またはナカライテスク (京都市) から購入して使用した。

2) *Kaempferia parviflora* (KP) の根茎試料と抽出条件

試料には日本国内でサプリメント製品として販売されているKP根茎の乾燥粉末を使用した。KP粉末は株式会社レーネから提供を受けた。乾燥粉末試料は40 mLの精製水と粉末2 gを混合して抽出した。熱水抽出条件は混合液を80°Cに設定したウォーターバス中で60分間インキュベートとした。得られた抽出液は2,500 rpm (800 × g) で10分間遠心分離した後、さらに濾過して得られた溶液をKP抽出液 (*Kaempferia parviflora* extract; KPE) として検証に使用した。KPEの固形分濃度は、5 mLをアルミトレイに入れた後、120°Cで2時間乾燥蒸発させた後、蒸発残分を秤量して算出した。

3) 糖化蛋白架橋形成抑制作用 (inhibition of glycated-protein cross-linking; IGPC)

糖化蛋白架橋形成抑制作用は既報^{16,17)}を参考に、リゾチーム-グルコース糖化蛋白架橋モデルを使用した。反応液は5 mg/mLリゾチームと0.5 mol/Lグルコースを含む0.1 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中に試料溶液を1/10量添加して作成した。反応液はリン酸緩衝液、リゾチーム溶液、グルコース溶液、試料溶液の全てを添加した溶液; (A)、Aのグルコース溶液の代わりに精製水を添加した溶液; (B)、Aの試料溶液の代わりに試料溶解液を添加した溶液; (C)、Cのグルコース溶液の代わりに精製水を添加した溶液; (D)を作成し、60°Cで40時間インキュベートした。反応終了後の反応液は3kDaの限外ろ過膜 (Amicon

Ultra-0.5 mL centrifugal filters Ultracel-3K ; Merck, Darmstadt, Deutschland)を用いて遠心ろ過し、低分子物質を除去した。その後、反応液は4-20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) に供した。泳動後のゲルはCBB Stain One (ナカライテスク、京都市中京区) で染色し、泳動像をPharos FX System (Bio-Rad) で画像化後、リゾチームの単量体 (monomer) (12.4 kDa)、二量体 (dimer) (25.8 kDa)、三量体 (trimer) (40.5 kDa) のバンドの強度をImageJ (NIH, Maryland, USA) で解析した。糖化蛋白架橋形成抑制作用のポジティブコントロール物質はAGを使用した。

蛋白架橋形成抑制率は既報¹⁴⁾と同様に、以下の式に基づいて算出した。

$$\text{蛋白架橋形成抑制率 (\%)} = \{1 - (A - B) / (C - D)\} \times 100$$

A - D ; 各反応液 SDS-PAGEゲル染色像のリゾチーム二量体または三量体のバンド強度

4) 糖化蛋白架橋切断作用 (cleavage of glycosylated-protein cross-linking ; CGPC)

糖化蛋白架橋切断作用は既報¹⁴⁾を参考に糖化リゾチーム (glycosylated lysozyme) を作成し、試料によるリゾチーム二量体の分解率を測定した。糖化リゾチームは1 mg/mLリゾチームと0.2 mol/Lグルコースを含む0.1 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.4) を37°Cで反応させた後、限外ろ過 (3 kDa) により低分子物質を除去して作成した。反応液は0.5 mg/mL糖化リゾチームを含む0.05 mmol/Lリン酸緩衝液中に試料溶液を1/2量添加した溶液 ; (A)、Aの試料溶液の代わりに試料溶解液を添加した溶液 ; (B) を作成した。反応液は37°Cでインキュベート後、反応液を限外ろ過膜 (3 kDa) で遠心ろ過し、低分子物質を除去した。反応液を前項と同様の方法でSDS-PAGEに供し、泳動後のゲルを染色し、画像化した後、反応液中リゾチーム単量体と二量体のバンド強度を解析した。糖化蛋白架橋切断作用のポジティブコントロール物質はPTBを使用した。

蛋白架橋切断率は既報¹⁸⁾と同様に以下の式に基づいて算出した。

$$\text{糖化蛋白架橋切断率 (\%)} = [1 - \{(D_S / M_S) / (D_R / M_R)\}] \times 100$$

S ; 試料添加時のリゾチームのバンド強度
R ; 試料溶解液のみを添加した時のリゾチームのバンド強度
M ; リゾチームの単量体バンド
D ; リゾチームの二量体バンド

統計解析

測定値は平均値±標準偏差で示した。また試料3濃度の作用結果から50%阻害濃度 (50% inhibition concentration;

IC₅₀; mg/mL) あるいは50%効果濃度 (50% effective concentration; EC₅₀; mg/mL) を算出した^{19, 20)}。IC₅₀あるいはEC₅₀は値が小さいほど作用が強いことを示している。測定値の比較にはテューキーの多重比較検定を用いた。統計解析結果は危険率5%未満を有意とした。

結果

糖化蛋白架橋形成抑制作用 (IGPC)

IGPCは二量体、三量体の形成抑制においてKPE (0.097 ~ 0.87 mg/mL)、AG (0.10 ~ 1.00 mg/mL) とともに濃度依存性が認められた (Table 1)。IGPCのIC₅₀はAGがKPEよりも二量体で3.7倍小さく、三量体で30.9倍小さく、AGが強い作用を示した。三量体と二量体のIGPCを比較するとKPE、AGとともに二量体と比べて三量体の形成抑制に強い作用を示した。SDS-PAGEの泳動像はKPE、AGともに、グルコースを添加して反応させた試料の単量体のバンドが、グルコース無添加の試料と比べてバンドサイズが陰極側にやや大きかった (Fig. 1)。

糖化蛋白架橋切断作用 (CGPC)

CGPCはKPE (0.1~1 mg/mL)、PTB (1.4~5.7 mg/mL) において濃度依存性が認められた (Table 2)。CGPCのEC₅₀はKPE (1.65 mg/mL) がPTB (2.65 mg/mL) よりも1.6倍小さく、強い作用を示した。Ref (水添加) の二量体形成率は10.3~11.9%で、三量体の形成は認められなかった (Fig. 2)。

考察

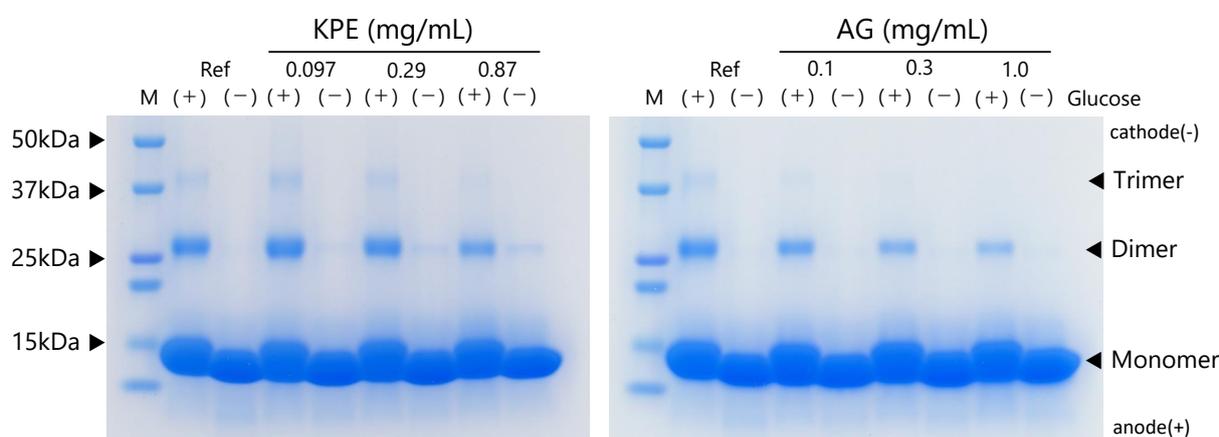
KPEのIGPC

KPEにはAGEs (蛍光性AGEs、ペントシジン、CML)、糖化反応中間体 (3DG、GO、MGO) 生成抑制作用が認められている¹³⁾。これらの作用にはKPEの親水性成分が関与している⁷⁾。架橋性を有するAGEsにはargpyrimidine、vesperlysine、crosslineなどがある⁸⁾。これらは蛍光性AGEs (励起波長370 nm、蛍光波長440 nm) として測定される。またペントシジンは蛍光性 (励起波長335 nm、蛍光波長385 nm) と架橋性を有する²¹⁾。さらに3DG、GO、MGOなどの糖化反応中間体はアルデヒドの一種であり、架橋性AGEsの生成に関与する^{22, 23)}。これらのことからKPの熱水抽出液であるKPEのIGPCはKPEのAGEsと糖化反応中間体の生成抑制作用が関与していると推定された。糖化による蛋白架橋形成はジスルフィド結合やリジロキシダーゼ (lysyl oxidase) による生理的な架橋形成 (善玉架橋) と異なり、無秩序な架橋を形成することから悪玉架橋 (pathological cross-linking) と言われる。皮膚や骨コラーゲンの糖化による悪玉架橋の形成は、皮膚弾力の低下、骨質の低下による骨折の要因と考えられている^{24, 25)}。KPE

Table 1. Inhibitory effects of KPE and AG on cross-linking formation in the lysozyme-glucose reaction model.

Sample	Conc. (mg/mL)	Inhibition ratio on cross-linking formation (%)			
		Dimer	IC ₅₀ (mg/mL)	Trimer	IC ₅₀ (mg/mL)
KPE	0.097	-3.4 ± 4.7	1.26 ¹⁾	-31.7 ± 10.8	0.51
	0.29	9.7 ± 3.1		21.8 ± 0.6	
	0.87	45.6 ± 3.9		76.8 ± 1.6	
AG	0.10	30.1 ± 4.3	0.34	72.9 ± 3.8	0.011
	0.30	49.2 ± 3.6		88.7 ± 2.8	
	1.00	65.9 ± 1.6		98.1 ± 3.3	

1) Extrapolated value, mean ± SD, n = 3; *p < 0.05, Tukey's multiple comparison test; KPE, incubation with *Kaempferia parviflora* rhizome hot water extract; AG, incubation with aminoguanidine; IC₅₀, 50% inhibition concentration; SD, standard deviation.

**Fig. 1. Inhibitory effects of KPE and AG on cross-linking formation in the lysozyme-glucose reaction model.**

5 mg/mL lysozyme were incubated at 60°C for 40 hours. SDS-PAGE was conducted using 4-20% acrylamide gels. M, molecular weight markers; Ref, incubation with water; KPE, incubation with *Kaempferia parviflora* rhizome hot water extract; AG, incubation with aminoguanidine; (+), incubation with 0.5 mol/L glucose; (-), incubation without glucose.

Table 2. Cleavage effects of KPE and PTB on lysozyme dimer in the glycosylated lysozyme.

Sample	Conc. (mg/mL)	Cleavage (%)	EC ₅₀ (mg/mL)
KPE	0.1	22.6 ± 7.9	1.65 ¹⁾
	0.3	34.5 ± 6.7	
	1	44.8 ± 4.0	
PTB	1.4	42.8 ± 6.5	2.65
	2.8	51.1 ± 9.1	
	5.7	58.4 ± 5.6	

1) Extrapolated value, mean ± SD, n = 3, *p < 0.05, Tukey's multiple comparison test; KPE, incubation with *Kaempferia parviflora* rhizome hot water extract; PTB, incubation with *N*-phenacylthiazolium bromide; EC₅₀, 50% effective concentration; SD, standard deviation.

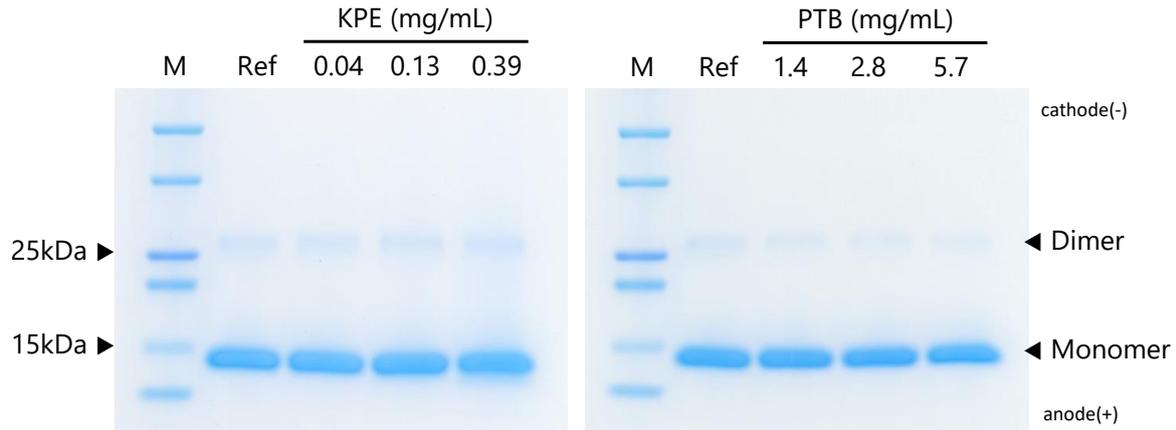


Fig. 2. Cleavage effects of KPE and PTB on lysozyme dimer in the glycosylated lysozyme.

0.5 mg/mL glycosylated lysozyme were incubated at 37°C for 16 hours. SDS-PAGE was conducted using 4-20% acrylamide gels. M, molecular weight markers; Ref, incubation with water; KPE, incubation with *Kaempferia parviflora* rhizome hot water extract; PTB, incubation with *N*-phenacylthiazolium bromide.

のIGPCは蛋白の架橋形成による硬化や機能低下を防ぎ、身体の老化抑制に機能する可能性がある。

IGPCのSDS-PAGE像において単量体のバンド幅はグルコース添加 (+) 試料がグルコース無添加 (-) と比べて陰極側に大きかった (Fig. 1)。アルデヒドでAGEs化したBSAのnative-PAGE泳動像は陽局側にシフトし、その要因として、蛋白表面の荷電が相対的に陰性に変化したことが推定されている²⁶⁾。SDS-PAGEではSDSが蛋白の荷電を中和していること、バンドのシフトが陰極側であったことから、グルコース (+) の単量体バンドの違いは蛋白の荷電変化と異なる要因が推定された。リゾチームとグルコースの糖化反応では架橋性AGEsだけでなく、CMLなど非架橋性AGEsも生成する。このため単量体のバンドシフトはリゾチームの非架橋性AGEsの生成が要因のひとつになっている可能性が考えられた。

KPEのCGPC

蛋白の糖化による架橋形成には α ジケトン、グルコspan、lysine-dihydropyridinium-lysine (K2P)^{27, 28)}の関与が報告されている。PTBを親水性化したalagebrium (3-phenacyl-4, 5-dimethylthiazolium chloride) は α ジケトンの切断作用があることからAGE Breakerと呼ばれている^{29, 30)}。KPEには α ジケトン切断作用が報告されている。しかしKPEとPTBの α ジケトン切断作用を1.42 mg/mLで比較したときKPEはPTBの1/5程度で弱かった¹³⁾。KPEのCGPCはPTBよりも1.6倍強く、 α ジケトン切断作用の評価結果と異なった。この差異の要因には糖化リゾチームの蛋白架橋に α ジケトン以外の架橋が多く含まれ、KPEの蛋白架橋切断作用が α ジケトン以外の架橋切断に強く作用した可能性が推定された。

糖化によって架橋形成した蛋白はプロテアーゼによる分解を受けにくいいため、新陳代謝されにくい³¹⁾。このため

CGPCは糖化によって架橋した蛋白の修復的作用に関与する可能性がある。一方、CGPCが作用する架橋構造は明確になっていない。特に蛋白の生理的架橋に対する影響は検証が必要である。

結語

KPEが糖化による蛋白の架橋形成に及ぼす影響を検証した結果、IGPCとCGPCが共に認められた。IGPCではKPEの架橋性AGEsおよびアルデヒド生成抑制作用の関与が推定された。CGPCではKPEの α ジケトン切断作用とともに、 α ジケトン以外の架橋切断作用も関与している可能性が推定された。KPEは糖化による蛋白架橋形成を抑制し、硬化や機能低下を防ぎ、身体の老化抑制に機能する可能性がある。

利益相反申告

本研究の実施にあたり株式会社レーネより研究費の支援を受けた。

謝辞

本研究結果の一部は第27回糖化ストレス研究会 (2023年9月9日、京都) で発表した。

参考文献

- 1) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycative stress and photo-aging in skin. *Anti-Aging Med.* 2011; 8: 23-29.
- 2) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 1. What is glycative stress? *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 152-155.
- 3) Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, et al. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science.* 1986; 232: 1629-1632.
- 4) Bolton WK, Cattran DC, Williams ME, et al. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol.* 2004; 24: 32-40.
- 5) Nakata A, Koike Y, Matsui H, et al. Potent SIRT1 enzyme-stimulating and anti-glycation activity of polymethoxyflavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Nat Prod Commun.* 2014; 9: 1291-1294.
- 6) Shimada N, Nakata N, Yang J, et al. Evaluation of the safety and efficacy of *Kaempferia parviflora* extract (SIRTMAX®) in human: A randomized double-blind, placebo-controlled crossover clinical study. *Jpn Pharmacol Ther.* 2015; 43: 997-1005.
- 7) Yagi M, Tateiwa Y, Inoue K, et al. Antiglycative effect of *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker (Zingiberaceae): Prevention of advanced glycation end product formation. *Glycative Stress Res.* 2018; 5: 163-170.
- 8) Rabbani N, Thornalley PJ. Glycation research in amino acids: A place to call home. *Amino Acids.* 2012; 42: 1087-1096.
- 9) Vasan S, Zhang X, Zhang X, et al. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks *in vitro* and *in vivo*. *Nature.* 1996; 382: 275-278.
- 10) Yagi M, Mitsuhashi R, Watanabe A, et al. Cleaving effect of pomegranate (*Punica granatum*) extract on crosslink derived from advanced glycation endproducts. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 58-66.
- 11) Takabe W, Mitsuhashi R, Parengkuan L, et al. Cleaving effect of melatonin on crosslinks in advanced glycation end products. *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 38-43.
- 12) Drickamer K. Breaking the curse of the AGEs. *Nature.* 1996; 382: 211-212.
- 13) Yagi M, Inoue K, Sato Y, et al. Antiglycative effect of black galangal, *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker (Zingiberaceae). *Glycative Stress Res.* 2021; 8: 1-7.
- 14) Yagi M, Hara H, Mifuru R, et al. Suppression of glycated protein cross-linking formation and cross-linking cleavage reaction of edible purple Chrysanthemum flower extract. *Glycative Stress Res.* 2022; 9: 7-14.
- 15) Yagi M, Sakiyama C, Kitaba T, Antiglycative effect of ferulic acid. *Glycative Stress Res.* 2022; 9: 186-193.
- 16) Perera HKI, Ranasinghe HASK. A simple method to detect plant based inhibitors of glycation induced protein cross-linking. *Asian J Med Sci.* 2015; 6: 28-33.
- 17) Perera HKI, Handuwalage CS. Analysis of glycation induced protein cross-linking inhibitory effects of some antidiabetic plants and spices. *BMC Complement Altern Med.* 2015; 15: 175.
- 18) Kim Y, Yokota S, Yagi M, et al. Cleavage of glycated protein cross-linking and cleavage of AGEs cross-linking of substances contained in vegetables and herbs. *Glycative Stress Res.* 2022; 9: 106-111.
- 19) Hori M, Yagi M, Nomoto K, et al. Experimental models for advanced glycation end product formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. *Anti-Aging Med.* 2012; 9: 125-134.
- 20) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging. 4: The evaluation of glycative Stress: Evaluation for anti-glycative effect. *Glycative Stress Res.* 2017; 4: 87-92.
- 21) Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem.* 1989; 264: 21597-21602.
- 22) Kato H, Shin DB, Hayase F. 3-Deoxyglucosone crosslinks proteins under physiological conditions. *Agric Bioi Chem.* 51; 1987: 2009-2011.
- 23) Shin DB, Hayase F, Kato H. Polymerization of proteins caused by reaction with sugars and the formation of 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Agric Bioi Chem.* 52; 1988: 1451-1458.
- 24) Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, et al. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest.* 1993; 91: 2463-2469.
- 25) Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: A possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* 2010; 21: 195-214.
- 26) Chikazawa M, Otaki N, Shibata T, et al. Multispecificity of immunoglobulin M antibodies raised against advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 2013; 288: 13204-13214.
- 27) Furber JD. Extracellular glycation crosslinks: Prospects for removal. *Rejuvenation Res.* 2006; 9: 274-278.
- 28) Cheng R, Feng Q, Argirov OK, et al. Structure elucidation of a novel yellow chromophore from human lens protein. *J Biol Chem.* 2004; 279: 45441-45449.
- 29) Bakris GL, Bank AJ, Kass DA, Advanced glycation end-product cross-link breakers. A novel approach to cardiovascular pathologies related to the aging process. *Am J Hypertens.* 2004; 17(12 Pt 2): 23S-30S.
- 30) Reddy VP, Aryal P, Darkwah EK. Advanced glycation end products in health and disease. *Microorganisms.* 2022; 10: 1848.
- 31) Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel E, et al. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J.* 2000; 350(Pt 2): 381-387.