

**METİLGİOKSAL VERİLEN RATLARDA KARNOZİNİN ANTIOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI***
**Investigation of Antioxidant Properties of Carnosine in Rats
Treated with Methylglyoxal**

Fatma DAĞLI¹, Cevat YAZICI², Kader KÖSE³

Özet : Reaktif karbonil bileşiklerinden olan metilglioksal (MGO)'ın, ileri glikasyon son ürünleri (advanced glycation end products; AGE) için bir prekürsör olduğu düşünülmekte ve AGE oluşumu, diyabetes mellitus, ateroskleroz, yaşlanma ve Alzheimer gibi pek çok hastalığın etiopatogenezinden sorumlu tutulmaktadır. Diğer taraftan endojen dipeptid olan karnozinin, antioksidan ve antiglikasyon özelliklere sahip olduğu ve bu etkileriyle, yukarıda belirtilen hastalıkların önlenmesinde faydalı olabileceği ileri sürülmektedir. Oksidatif ve karbonil stres üzerine MGO'nun muhtemel etkilerini değerlendirmek ve karnozin varlığında, bu etkilerin ne şekilde değişebileceğini araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada; dört gruba ayrılan erkek ratlara 10 gün boyunca intraperitoneal olarak, her gün kg rat ağırlığı başına 1 ml serum fizyolojik (Kontrol grubu), 50 mg MGO (MGO grubu), 200 mg karnozin (Karnozin grubu) ve 50 mg MGO/200 mg karnozin (MGO-Karnozin grubu) uygulandı. Ratlardan elde edilen plazma örneklerinde malondialdehit (MDA) ve protein karbonil bileşikleri (PCC) düzeyleri tayin edildi. MGO grubunda bulunan ratların zayıfladıkları ve MGO ile birlikte verilen karnozinin kilo kaybını önemli ölçüde önlediği tespit edildi ($p<0.05$). MGO grubunda MDA ve PCC seviyelerinin anlamlı şekilde yükseldiği ($p<0.05$); MGO ile karnozinin kombine olarak verildiği grupta MDA ve PCC seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı ($p<0.05$) belirlendi. Sonuç olarak, patogenezinde AGE oluşumunun rol oynadığı hastalıklarda karnozinin ilave bir terapötik ajan olarak kullanılması önerilebilir.

Anahtar kelimeler: Metilglioksal, karnozin, oksidatif stres, karbonil stres, rat.

Summary : Methylglyoxal (MGO), one of the reactive carbonyl compounds, is thought to be a precursor for advanced glycation end products (AGE) which are responsible for disorders such as diabetes mellitus and atherosclerosis. On the other hand carnosine, endogen dipeptid, has been suggested to be useful for preventing the disorders mentioned above due to its antioxidant and antiglycation properties. In this study, four groups of male rats were intraperitoneally treated with daily 1 ml serum physiologic (control group), 50 mg MGO (MGO group), 200 mg carnosine (carnosine group) and 50 mg MGO/200 mg carnosine (MGO-carnosine group), per kg of rat weight, for 10 days in order to investigate the effects of MGO on oxidative and carbonyl stress and also whether these effects may be influenced in the presence of carnosine. The levels of malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl compounds (PCC) were measured in plasma samples obtained from these groups.

Although weight-lose was observed in MGO given rats, it was prevented in the presence of carnosine ($p<0.05$). Plasma MDA and PCC levels were found to be higher in MGO group ($p<0.05$); but these values were significantly decreased in the group given MGO together with carnosine ($p<0.05$). As a result, it may be suggested that carnosine may be used as an additional therapeutic agent in diseases which AGE formation has a role in their pathogenesis.

Key words: Carnosine, methylglyoxal, rat, malondialdehyde, protein carbonyl compounds.

¹ Bilim Uz.Erciyes Ün.Sağlık Bil.Ens.Biyokimya AD, Kayseri

² Doç.Dr.Erc. Ün.Tıp Fak.Biyokimya AD, Kayseri

³ Prof.Dr.Erc. Ün.Tıp Fak.Biyokimya AD, Kayseri

* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBY.03.04 nolu proje ile desteklenmiştir.

Enzimatik ve nonenzimatik reaksiyonlarla, hem aerobik hem de anaerobik şartlarda oluşabilen, yapılarında karbonil grubu bulunduran 3-deoksiglukozon (3-DG), glioksal, metilglioksal (MGO), malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi bileşiklere, reaktif karbonil bileşikleri (reactive carbonyl compounds; RCC) adı verilmekte (1) ve RCC, protein yapılarında bulunan arginin, lizin ve sistein artıklarının amino ve tiyol grupları ile reaksiyona girerek protein üzerinde karbonil grupları (protein carbonyl compounds; PCC)'nin oluşumuna neden olmaktadır (2). Organizmada RCC ve dolayısıyla PCC seviyelerinin artması da "karbonil stres" olarak tanımlanmaktadır (3).

Daha da önemlisi, bu modifiye protein yapıları, glikasyon/glikoksidasyon olarak adlandırılan bir dizi reaksiyonla intra- ve inter-moleküler çapraz bağlanmalar yaparak, ileri glikasyon son ürünleri (advanced glycation end products; AGE)'ni oluşturmaktadır (1,3). Günümüzde, AGE oluşumu ve karbonil stres, diyabetes mellitus (DM), ateroskleroz, yaşlanma ve Alzheimer gibi pek çok hastalığın etiyopatogenezinden sorumlu tutulmaktadır (3).

Deney hayvanlarıyla oluşturulan diyabet modellerinde (4) ve DM'li hastalarda (5), MDA, 4-HNE, MGO, glioksal ve 3-DG gibi RCC düzeyleri yüksek olduğundan (4,5); toksik etki ve/veya komplikasyonların hangi bileşikten, hangi oranda ve hangi mekanizmalarla oluştuğunu belirlemek, ancak her bir molekülün izole olarak kullanıldığı, deneysel çalışmalarla ortaya konulabilir. MGO'nun, doku ve plazmada başlıca AGE prekürsörü oluşu; DM hastalarında yüksek seviyelerde bulunması; karbonil stresin yanı sıra, serbest oksijen radikalleri (SOR) üreterek oksidatif strese, mutasyonlara ve apoptoza neden olması gibi pek çok faktör (6), deneysel çalışmalarda toksik ajan olarak MGO kullanımına yol açmaktadır.

Diğer taraftan, AGE oluşumunu önlemek için, çeşitli farmakolojik ajanlar geliştirilmektedir. Aminoguanidin, etanol gibi ajanlarla AGE oluşumunun önlenilebileceği gösterilmişse de (7,8); bu ajanların nörotoksite, vitamin B6 eksikliği gibi

yan etkiler göstermesi, klinik kullanımlarını kısıtlamaktadır (8). Son yıllarda endojen dipeptid olan karnozinin, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla, hem antioksidan hem de anti-glikasyon etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (9). Ancak, literatürde karnozinin, MGO ile indüklenen protein modifikasyonunu *in vitro* şartlarda önleyebildiği gösterilmesine rağmen (10,11), *in vivo* etkisini gösteren bir çalışma mevcut değildir.

Bu çalışma, rat modeli üzerinde, günümüzde birçok hastalığın etiyopatogenezine dahil edilen oksidatif ve karbonil stres üzerine MGO'nun muhtemel etkilerini değerlendirmek ve ayrıca karnozin varlığında, bu etkilerin ne şekilde değişebileceğini araştırmak amacıyla yapıldı. Ratlardan elde edilen plazma örneklerinde oksidatif stres göstergesi olan MDA ve protein oksidasyonunun göstergesi olan PCC düzeyleri tayin edildi.

GEREÇ ve YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan bu çalışma, Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nde yapıldı.

DEKAM'dan temin edilen Sprague-Dawley, 90-120 günlük, ortalama 250 gr ağırlığında, 52 erkek rat çalışma grubunu oluşturdu. Deney süresince, 12 saat aydınlık/ karanlık ışık döngüsünde, normal oda sıcaklığı ve neminde tutulan ratlar, standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi. Çevreye uyumlarını sağlamak amacıyla, çalışmaya başlamadan en az bir hafta önce, ratlar aynı deney ortamına alındı.

Ratlara verilecek MGO ve karnozin dozunu, uygulama süresini ve şeklini belirlemek amacıyla, 12 ratla yapılan ön-çalışmanın verilerine göre; ratlar, MGO, karnozin ve MGO-karnozin uygulanan gruplar ve kontrol olmak üzere, her biri 10 rat içeren, 4 gruba ayrıldı. Uygulama öncesi, çalışma süresince (üç gün arayla) ve deney sonunda tartılan ve ratların kilogram ağırlığı başına günlük uygulanacak MGO ve/veya karnozin dozları, her gün se-

rum fizyolojik ile uygun şekilde dilüe edilerek, 10 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulandı (Tablo I).

Son enjeksiyonu takiben, bir gece aç bırakılan ratların kanları, 80 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer, 50 mg/ml'lik solüsyon) ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer, %2'lik solüsyon) anestezisi altında, abdominal aortadan heparinize enjektöre alındı. Kan örnekleri, +5°C'de 2000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen plazma örnekleri, çalışma gününe kadar, -20 °C'de dondurularak saklandı.

Plazma MDA seviyeleri; Ohkawa ve ark (12) tarafından geliştirilen ve MDA'nın, tiyobarbitürik asit

ile oluşturduğu pembe kompleksin renk şiddetinin 532 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanan metoda göre tayin edildi. Plazma PCC düzeylerinin ölçümünde, Reznick ve Packer (13) tarafından geliştirilen ve protein yapısında bulunan karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin ile oluşturdukları hidrazonların renk şiddetinin 360 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanan metod kullanıldı. MDA ve PCC düzeyleri, litre plazma başına mikromol olarak verildi (mmol/L).

İstatistiki karşılaştırma, "SPSS 10.0 for Windows" bilgisayar paket programı ile eşleştirilmiş *t* testi, ANOVA ve post-ANOVA(Scheffe prosedür) testleri kullanılarak yapıldı. Tüm istatistiki karşılaştırmalarda, anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Tablo I. Çalışma grubunu oluşturan ratların deney planı

Grup	Uygulanan Doz (mg/ kg rat ağırlığı/gün)
Kontrol	Serum fizyolojik (1 ml)
MGO	50 mg MGO
Karnozin	200 mg Karnozin
MGO-Karnozin	50 mg MGO/200 mg Karnozin

BULGULAR

Çalışma sırasında, MGO ve karnozin-MGO gruplarında birer rat öldü. Çalışma öncesi, vücut ağırlığı bakımından, gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$). Çalışmanın sonunda ratların vücut ağırlıkları, çalışma öncesi değerleriyle karşılaştırıldığında; kontrol ve karnozin gruplarını oluşturan ratların ağırlıklarının arttığı ($p < 0.05$) ve benzer şekilde karnozin-MGO grubundaki ratların da, istatistiki önemi olmasa da, kilo aldıkları belirlendi. Buna karşılık, MGO grubunda bulunan ratların zayıfladıkları tespit edildi ($p < 0.05$). Çalışmanın sonunda, grupların vücut ağırlıkları birbiriyle karşılaştırıldığında, kontrol ve karnozin grupları arasında fark olmadığı ($p > 0.05$); bu gruplarla karşılaştırılan MGO grubundaki ratların anlamlı şekilde kilo kaybettiği belirlendi ($p < 0.05$). MGO-karnozin grubunda, MGO ile birlikte verilen karnozinin kilo kaybını önemli ölçüde önlediği ($p < 0.05$) ve bu gruptaki ratların vücut ağırlığının kontrol ve

karnozin gruplarından farklı olmadığı ($p > 0.05$) belirlendi (Tablo II). Ayrıca, MGO grubunu oluşturan ratların günlük aktivitelerinin azaldığı ve uyaranlara tepki vermedikleri gözlemlendi.

Çalışma gruplarını oluşturan ratların plazma MDA ve PCC düzeyleri Tablo III'te gösterildi. Kontrol ve karnozin grupları arasında plazma MDA ile PCC bakımından fark olmadığı ($p > 0.05$); bu gruplarla karşılaştırılan MGO grubunda ise MDA ve PCC'nin yükseldiği ($p < 0.05$) ve hatta MGO grubu MDA değerlerinin karnozin grubuna göre yaklaşık 2 kat arttığı tespit edildi (Tablo III).

Diğer taraftan MGO grubuna göre, MGO ile karnozinin kombine olarak verildiği grupta MDA ve PCC seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı ($p < 0.05$) ve bu grubun MDA ile PCC düzeyleri, sayısal olarak daha yüksek olsa bile, istatistiki bakımdan kontrol ile karnozin gruplarından farklı olmadığı ($p > 0.05$) saptandı (Tablo III).

Tablo II. Ratların çalışma öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları

Gruplar	n	Rat Ağırlığı (g)		t	p
		Önce (X±SD)	Sonra (X±SD)		
Kontrol	10	251.6 ± 8.4	256.1 ± 7.3	3.16	p<0.012
Karnizon	10	242.7 ± 20.2	249.8 ± 15.0	3.33	p<0.009
MGO	9	252.0 ± 11.0	216.3 ± 17.4 ^{*a}	8.35	p<0.005
Karnizon MGO	9	260.4 ± 11.1	265.7 ± 22.1 ^b	0.893	p>0.005

ANOVA, post-ANOVA testi sonuçlarına göre :

* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05

b : MGO grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05

a : Karnozin grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05

Tablo III. Ratlarda plazma MDA ve PCC seviyeleri

Gruplar	n	MDA (mmol/L)	PCC (mmol/L)
		(X±SD)	(X±SD)
Kontrol	10	4.02 ± 1.60	7.36 ± 1.82
Karnizon	10	3.44 ± 1.05	8.79 ± 1.81
MGO	9	6.72 ± 0.78 ^{*a}	12.76 ± 0.91 ^{*a}
Karnizon MGO	9	2.67 ± 0.59 ^b	9.51 ± 1.17 ^b

ANOVA, post-ANOVA testi sonuçlarına göre :

* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05

b : MGO grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05

a : Karnozin grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05

TARTIŞMA

Günümüzde AGE oluşumu ve karbonil stres, başta DM komplikasyonları olmak üzere ateroskleroz, yaşlanma, Alzheimer gibi hastalıkların etiyopatogenezinde rol oynamaktadır (3).

Karbohidrat, lipid gibi farklı biyomoleküllerden oluşan çok sayıdaki RCC'den hangisinin, özellikle AGE oluşumundan ve dolayısıyla patolojik tabloların gelişiminden sorumlu olduğunu kesin olarak belirlemek oldukça güç olmasına rağmen; MGO'nun AGE oluşumu için başlıca prekürsör olduğu (14); DM hastalarında yüksek seviyelerde bulunduğu (5) ve 3-DG'ye göre proteinlerdeki arginin artıklarına karşı 200 kat daha reaktif olduğu

(15) gösterilmiştir. Bu nedenle, protein glikasyonu ve oksidatif streste MGO'nun yerini daha iyi belirleyebilmek amacıyla, bu çalışmada toksik ajan olarak tek başına MGO kullanılmıştır.

Oksidatif ve karbonil stresin tayininde, MDA, 4-HNE gibi lipid peroksidasyonu ürünleri ile tiyol oksidasyonu ve PCC gibi protein oksidasyon ürünleri sıklıkla kullanılmaktadır (2). Literatürde SOR, MDA, PCC, tiyol bileşikleri (sülfidril grupları, GSH, sistein) ve antioksidan enzimler gibi parametreler üzerinden MGO etkilerini inceleyen *in vitro* (16-18) ve *in vivo* (19,20) çalışmalar, MGO'nun oksidan-antioksidan sistem üzerine etkilerini açıklayan farklı mekanizmalar öne sürmektedir.

MGO ile muamele edilen ovalbüminin, PCC içeriğinin arttığı ve yüksek molekül ağırlıklı polipeptidlerin oluştuğu gösterilmiştir (10). Eşit konsantrasyonda MGO, askorbik asit ve gliksal ile inkübe edilen sığır lens proteinlerinin serbest tiyol içeriklerinin azaldığı ve PCC düzeylerinin yükseldiği gözlenmiştir. En yüksek PCC düzeylerinin MGO ile elde edilmesi, protein karbonilasyonuna neden olan en zararlı RCC'nin MGO olduğu fikrini doğurmuştur (17). MGO'nun protein yapısındaki arginin, lizin ve histidin artıklarını modifiye ettiği ve lizil -NH₂ ve histidilimidazol gruplarıyla PCC oluşturduğu bildirilmektedir (21). Bu çalışmada da, MGO verilen ratların plazma PCC düzeylerinin kontrole göre yaklaşık 2 kat arttığı belirlendi. Daha da önemlisi, literatürdeki *in vitro* çalışmalara ilaveten; MGO'nun yüksek PCC düzeyleri üzerinden protein oksidasyonuna yol açtığını gösteren bu ilk *in vivo* çalışma, diyabeti de içine alan birçok hastalığın etiopatogenezinin anlaşılmasına katkıda bulunacaktır.

MGO'nun oksidatif strese neden olduğunu MDA üzerinden gösteren literatürdeki tek *in vivo* çalışmada, farelere ip olarak tek doz uygulanan MGO'nun; 100 mg/kg ve üstündeki dozlarda karaciğer MDA seviyelerini artırdığı gösterilmiştir (19). Benzer şekilde, bu çalışmada da MGO'nun plazma MDA düzeylerini artırdığı belirlendi.

AGE ve SOR oluşumunu önlemek amacıyla aminoguanidin, etanol, anjiyotensin konverting enzim blokerleri gibi antioksidan ve/veya antiglikasyon özellik gösteren çeşitli bileşiklerle çalışmalar yapılmasına rağmen (7,8); bu ajanların nörotoksitesite, vitamin B6 eksikliği gibi yan etkiler göstermesi, klinik kullanımlarını kısıtlamaktadır (8). Halbuki AGE oluşumunu önleyecek ajan, her şeyden önce endojen ve antioksidan özellikte olmalı, RCC bileşiklerinin etkisini önlemeli, AGE oluşan bölgelere kolayca ulaşabilmeli ve, toksik olmamalıdır. Suda çözünebilen endojen bir dipeptid olan karnozin, bu özelliklerin çoğuna sahiptir ve yara iyileşmesi, immünoestimülasyon, tamponlama, membranları koruma ve yaşlanmayı önleme gibi iyi bilinen etkilerinin yanı sıra, son yıllarda antioksidan ve antiglikasyon özellikleriyle de dikkat çekmektedir (22). Bu nedenle patogenezinde AGE

bulunan hastalıkların tedavisinde, karnozinin ideal bir "anti-AGE" bileşiği olarak kullanılabilceği görüşü, gün geçtikçe önem kazanmaktadır (23,24).

Karnozinin, antioksidan ve antiglikasyon etkilerini gösteren *in vivo* (25,26) ve *in vitro* çalışmalara ilaveten (10,11); HO[•], LOO[•], O₂^{-•}, ¹O₂ ve HOCl gibi SOR türevleri ile direkt etkileşerek hücreye ilave antioksidan güç sağladığı (22), ayrıca metal şelasyonu yoluyla da antioksidan özellik gösterdiği (27,28) bildirilmektedir. Karnozinin, MDA ve HOCl ile inkübe edilen BSA, ovalbümin ve a-kristalin gibi model proteinlerde PCC oluşumunu ve endojen karbonil bileşikleriyle SOD, a-kristalin, katalaz gibi proteinlerin oluşturduğu *in vitro* glikasyonu önlediği bildirilmekte (29) ve karnozin, günümüzde "doğal antiglikasyon ajan" olarak tanımlanmaktadır (24). Dahası, antioksidan/ antiglikasyon etkileriyle rat beyin endotelial hücrelerini β-amiloid toksitesitesinden korumada; anserin, β-alanin, SOD gibi diğer endojen bileşiklere göre, karnozinin daha potent olduğu bildirilmiştir (30).

Karnozinin MGO ile modifiye edilen proteinler üzerinde de antiglikasyon etkileri gösterilmiştir. MGO ile 1 ila 7 gün boyunca, 37 °C'de inkübe edilen ovalbümin üzerinde oluşan karbonil sayısının, inkübasyon süresi uzadıkça, intra- ve intermoleküler çapraz bağlanmalar nedeniyle giderek azaldığı bildirilmekte ve aynı ortama ilave edilen karnozinle, azalma oranı %56'ya ulaşmaktadır (10). Benzer bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda MGO ile inkübe edilen ovalbümin ve lizin çözeltilerindeki kahverengileşme, elektroforetik mobilitede azalma, molekül ağırlığında artma gibi protein modifikasyonuna bağlı değişiklikler, karnozin varlığında önlenilmektedir (11).

Literatürde MGO ve karnozinin birlikte kullanıldığı *in vivo* bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yukarıda verilen *in vitro* çalışmaların bulgularını destekleyecek şekilde; bu çalışmada da ratlara MGO ile beraber verilen karnozinin, MGO ile yükselen plazma MDA ve PCC düzeylerini düşürdüğü gözlenmiştir. Karnozinin koruyucu etkilerinin bu *in vivo* çalışmayla gösterilmesi, hem literatüre büyük katkı sağlayacak hem de karnozinin AGE ile ilişki-

li hastalıklarda antiglikasyon ajanı olarak, standart tedavi protokollerine eklenmesini gündeme getirebilecektir.

Bu çalışmanın bulguları ve literatür bilgileri birlikte değerlendirildiğinde; endojen bir RCC olan MGO'nun, yüksek plazma MDA ve PCC değerleriyle yansıtıldığı gibi, lipid/protein oksidasyonuna ve dolayısıyla AGE oluşumuna neden olduğu söylenebilir. Benzer şekilde endojen bir dipeptid olan karnozinin, antioksidan ve antiglikasyon özellikleriyle, MGO ile yükselen plazma MDA ve PCC değerlerini düşürdüğü, böylece organizmayı oksidasyondan koruyabileceği öne sürülebilir.

Sonuç olarak, etiopatogenezinde AGE oluşumunun sorumlu tutulduğu hastalıklarda karnozinin ilave bir terapötik ajan olarak kullanılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes* 1999, 48: 1-8.
2. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, et al. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2005, 24: 55-99.
3. Lyons TJ. Glycation, carbonyl stress, EAGLEs, and the vascular complications of diabetes. *Semin Vasc Med* 2002, 2: 175-189.
4. Kyselova Z, Gajdosik A, Gajdosikova A, Ulicna O, Mihalova D, Karasu C, Stefek M. Effect of the pyridoindole antioxidant stobadine on development of experimental diabetic cataract and on lens protein oxidation in rats: comparison with vitamin E and BHT. *Mol Vis*. 2005, 11:56-65.
5. Miyata T, Ishikawa N, van Ypersele de Strihou C. Carbonyl stress and diabetic complications. *Clin Chem Lab Med*. 2003, 41:1150-1158.
6. Kalapos MP. Methylglyoxal in living organisms. *Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. Toxicol Lett* 1999; 110: 145-175.
7. Bonfanti L, Peretto P, De Marchis S, Fasolo A. Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. *Prog Neurobiol* 1999, 59: 333-353.
8. Miyata T. Alterations of non-enzymatic biochemistry in uremia, diabetes, and atherosclerosis ("carbonyl stress"). *Bull Mem Acad Med Belg* 2002, 157: 189-196.
9. Hipkiss AR, Brownson C. A possible new role for the anti-ageing peptide carnosine. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:747-753.
10. Hipkiss AR, Chana H. Carnosine protects proteins against methylglyoxal-mediated modifications. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 248:28-32.
11. Hipkiss AR, Brownson C, Carrier MJ. Carnosine the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mech Ageing Dev* 2001, 122: 1431-1445.
12. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1978, 95: 351-358.
13. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994, 233: 357-363.
14. Thornalley PJ. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J* 1990, 269: 1-11.
15. Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study

- with *N* alpha-acetylarginine, *N* alpha-acetylcysteine, and *N* alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem* 1994, 269: 32299-32305.
16. Kalapos MP, Littauer A, de Groot H. Has reactive oxygen a role in methylglyoxal toxicity? A study on cultured rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 1993, 67:369-372.
 17. Argirova M, Breipohl W. Comparison between modifications of lens proteins resulted from glycation with methylglyoxal, glyoxal, ascorbic acid, and fructose. *J Biochem Mol Toxicol* 2002, 16: 140-145.
 18. Kang JH. Modification and inactivation of human Cu,Zn-superoxide dismutase by methylglyoxal. *Mol Cells* 2003, 15: 194-199.
 19. Choudhary D, Chandra D, Kale R.K. Influence of methylglyoxal on oxidant enzymes and oxidative damage. *Toxicol Lett* 1997, 93: 141-152.
 20. Golej J, Hoeger H, Radner W, Unfried G, Lubec G. Oral administration of methylglyoxal leads to kidney collagen accumulation in the mouse. *Life Sci* 1998, 63: 801-807.
 21. Thornalley PJ. The clinical significance of glycation. *Clin Lab* 1999, 45: 263-273.
 22. Garibella SE, Sinclair AJ. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential, *Age Ageing* 2000, 29: 207-210.
 23. Munch G, Thome J, Foley P, Schinzel R, Riederer P. Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 1997, 23:134-143.
 24. Hipkiss AR, Brownson C, Bertani MF, Ruiz E, Ferro A. Reaction of carnosine with aged proteins: another protective process? *Ann N Y Acad Sci* 2002, 959: 285-294.
 25. Nagaraj RH, Sarkar P, Mally A, Biemel KM, Lederer MO, et al. Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. *Arch Biochem Biophys* 2002, 402: 110-119.
 26. Gallant S, Semyonova M, Yuneva M. Carnosine as a potential anti-senescence drug. *Biochemistry (Mosc)* 2000, 65:866-868.
 27. Bogardus SL, Boissonneault GA. Carnosine inhibits *in vitro* low-density lipoprotein oxidation. *Nutr Res* 2000, 20: 967-976.
 28. Decker EA, Livisay SA, Zhou S. A re-evaluation of the antioxidant of purified carnosine. *Biochemistry (Mosc)* 2000, 28: 1564-1570.
 29. Hipkiss AR, Worthington VC, Himsworth DT, Herwig W. Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1380: 46-54.
 30. Preston JE, Hipkiss AR, Himsworth DT, Romero IA, Abbott JN. Toxic effects of beta-