

## МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ РЕАКЦИИ ГЛИКОКСИДАЦИИ\*

**Р.А. Литвинов, В.А. Косолапов, Е.А. Муравьева, И.В. Скачко, Д.Д. Шамшина**

*ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
лаборатория метаболитных лекарственных средств НЦИЛС ВолгГМУ*

В статье рассмотрена частная модель реакции гликирования, именуемая гликоксидацией и отличающаяся значительным вовлечением окислительных реакций и участием металлов переходной валентности. Усиление окислительных процессов, позволяющее идентифицировать реакцию как гликоксидацию, реализовано за счет введения в среду протекания реакции катионов меди (II) ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) в доступной для взаимодействия с участниками реакции форме. Основные участники реакции гликоксидации, помимо  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : бычий сывороточный альбумин (1 г/л), глюкоза (0,5 М), HEPES-буферный раствор (24 г/л) растворенные в деионизированной воде. Подобраны условия, при которых реакция гликоксидации линейно зависит от концентрации катионов меди (II), что делает активность катионов чувствительной мишенью при контроле протекания реакции. Зависимость реакции от концентрации  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в представленных экспериментальных условиях подтверждена экспериментально и математически. Установлен аналитический диапазон концентраций  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , в котором наблюдается линейная зависимость образования КПГ от концентрации. Для концентрации  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , производящей наибольший потенцирующий эффект на образование КПГ (10 мг/л), методика валидирована по показателям внутрилабораторной воспроизводимости и сходимости. Методика представляет интерес для последующего определения антигликоксидативной активности новых соединений.

*Ключевые слова:* гликоксидация,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , HEPES, бычий сывороточный альбумин, глюкоза, конечные продукты гликирования (КПГ).

DOI 10.19163/1994-9480-2020-2(74)-61-66

## A MODIFIED METHOD FOR STUDYING THE GLYCOXIDATION REACTION

**R.A. Litvinov, V.A. Kosolapov, E.A. Muravyova, I.V. Skachko, D.D. Shamshina**

*FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation,  
Laboratory of Metabotropic Drugs, Scientific Center for Innovative Drugs VolgSMU*

The article considers a particular model of the glycation reaction, called glycoxidation and characterized by a significant involvement of oxidative reactions and the participation of transition metals. The enhancement of oxidative processes, which makes it possible to identify the reaction as glycoxidation, was realized by introducing copper (II) cations ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) into the reaction medium in a form accessible for interaction with the reaction participants. The main reagents in the glycoxidation reaction, in addition to  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  are bovine serum albumin (1 g/l), glucose (0,5 M), HEPES buffer solution (24 g/l) dissolved in deionized water. The conditions have been selected under which the glycoxidation reaction linearly depends on the concentration of copper (II), which makes the cation activity a sensitive target when monitoring the reaction. The dependence of the reaction on the concentration of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  under the presented experimental conditions has been confirmed experimentally and mathematically. An analytical range of concentrations of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  has been established, in which a linear dependence of AGE formation on concentration is observed. For the concentration of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , which produces the greatest potentiating effect on the AGE formation (10 mg/l), the procedure was validated by the indices of internal laboratory reproducibility and convergence. The technique is of interest for investigation of the antiglycoxidative activity of novel compounds.

*Key words:* Glycoxidation,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , HEPES, bovine serum albumin, glucose, glycation end products (AGE).

Сахарный диабет (СД) остается одной из значимых медико-социальных проблем. В мире насчитывается 463 000000 людей с СД [5]. Одной из значимых причин, ограничивающих качество жизни и повышающих риск смерти при СД, являются поздние осложнения (ПОСД), развивающиеся даже на фоне гликемического контроля, отвечающего требованиям стандартов качества [6].

Многие лекарственные средства, применяемые с целью лечения ПОСД, не учитывают их молекулярно-биологический патогенез, в котором значительная роль отведена образованию конечных продуктов (КПГ) и их действию на организм [12, 13].

В доклинических исследованиях новых антигликирующих соединениях на скрининговом этапе наиболее часто применяется тест-система оценки антигликирующей активности, основанная на гликировании бычьего сывороточного альбумина (БСА) в фосфатном буферном растворе при pH 7.4. Процесс образования КПГ многостадийный, протекает по множеству механизмов (реакции, зависящие и независимые от окисления, протекающие при различных pH среды, зависящие от активности металлов переходного ряда [3]). Учитывая условия распространенной модели, можно полагать, что не все из реакций образования КПГ в ней будут в полной мере реализованы.

\*Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ МК-1887.2020.7.

В частности, гликирование, протекающее в окислительной среде в присутствии катионов меди, именуется гликоксидацией [8]. Гликоксидация протекает по дополнительным механизмам, связанным с реакцией Фентон, ускоренным образованием реактивного ациклического иона иминия при протекании перегруппировки Амадори, ускорением процесса аутоокисления гликоальдегида до глиоксаля и др. [3].

Настоящая работа посвящена описанию модификации распространенной модели гликирования с целью настройки на ее основе методики гликоксидации и валидации этой модели. Предлагается к проверке гипотеза о том, что присутствие катионов меди в реакционной среде может не просто потенцировать образование КПП, но и иметь решающее значение при протекании реакции гликоксидации. Разработка, представленная в статье, позволит повысить эффективность скринингового этапа при поиске новых соединений.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Настройка и валидация метода гликоксидации бычьего сывороточного альбумина глюкозой в присутствии  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

### Экспериментальная процедура

В основу модели положена методика реакции гликирования БСА глюкозой в фосфатном буферном растворе. Исходная методика многократно использована коллективом авторов и описана [9, 7, 1, 10]. Модификация проведена с опорой на данные литературы [11].

**Суть модификации.** Проведены следующие изменения относительно исходных условий протекания реакции:

1. Устранено действие фосфат-анионов. Соли фосфатного буферного раствора не используются по причине быстрого реагирования компонентов с источником катионов меди –  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Также исключаются реакции, обусловленные каталитической активностью фосфат-анионов. В качестве буферного агента используется HEPES.

2. Нейтральная pH среды (7,4) заменена на кислую (5,8). Кислая реакция среды, создаваемая HEPES, замедляет нуклеофильное присоединение.

3. Присутствуют низкие концентрации  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Предполагается, что катионы  $\text{Cu}^{2+}$  позволяют обойти энергетический барьер при реакции нуклеофильного присоединения в кислой среде, обеспечивая протекание реакции через формирование промежуточного комплекса. Кроме того, катионы катализируют металл-зависимые реакции при гликировании и способствуют образованию АФК.

4. В качестве растворителей для потенциальных новых соединений, активность которых будет

изучена на данной модели, может быть использована исключительно деионизированная вода. В исходной тест-системе реакции гликирования в фосфатном буферном растворе в качестве растворителя для соединений часто используется диметилсульфоксид (ДМСО, конечная концентрация 3 %), однако, учитывая его антирадикальную и хелатирующую активности, в данной модификации он неприменим. Нами оценено влияние ДМСО на процесс гликоксидации при описанных выше экспериментальных условиях (данные не представлены). Установлено, что ДМСО инактивирует реакцию, устраняет концентрационно-зависимые различия между подгруппами, содержащими  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в разных концентрациях.

**Описание методики.** Субстрат гликирования: БСА (1 мг/мл); индуктор гликирования: глюкоза (0,5 М); среда протекания реакции: HEPES-буферный раствор (2,4 г на 100 мл, pH 5,8), с различным содержанием  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0, 5, 10 или 15 мг/л); условия протекания реакции: температура 60 °C; длительность инкубации: 24 часа. Растворение всех реагентов производили с применением деионизированной воды (деионизатор Prodeion 10 VS). После постановки реакции гликоксидации БСА осаждали при помощи трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация 10 %) и центрифугирования (15 000 rpm, 4 °C, 4 мин) (центрифуга Sigma, Япония). Жидкую фракцию аспирировали. Осадок растворяли в фосфатном буферном растворе (pH 10,5). Аликвоты раствора вносили в 96-луночный планшет (GreinerFlatBlack, 96), определяли флуоресценцию КПП на длинах волн возбуждения/испускания 370–440 нм соответственно на микропланшетном ридере (Infinite 220 Pro, TECAN, Австрия).

### Подтверждение действительного участия катионов меди как определяющего фактора при протекании реакции

Для проверки гипотезы о действительности вклада катионов меди (II) в образование КПП сформирован алгоритм: 1) визуальный анализ по всем подгруппам количественных признаков на основе частотного распределения данных в подгруппах (Statistica 12, «Correspondence Analysis»); 2) кластеризация всего массива данных для оценки группировки данных по подгруппам согласно их фактической принадлежности и присвоение категориального значения класса каждой непрерывной величине в подгруппах (Statistica 12, «k-Means Cluster Analysis»); 3) анализ таблиц частот при помощи критерия Хи-квадрат для подтверждения статистической значимости изменения величины значений между подгруппами; 4) проверка законов распределений количественных признаков в отдельных подгруппах и определение их значений (оценка групповым средним, медианам, дисперсии), для аргументации использования критериев сравнения данных (GraphPad Prism 7.0, критерии

Таблица 1

Фактические значения, частотный анализ и математическое описание данных об уровнях флуоресценции в пробах, содержащих различные концентрации  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  для каждой подгруппы

при оценке распределения данных: критерий Колмогорова – Смирнова, критерий Пирсона, критерий Шапиро – Уилка; критерии при межгрупповом сравнительном анализе: критерий Краскела – Уоллиса, пост-тест Данна,  $p < 0,05$ ); 5) регрессионный анализ данных и установление аналитического диапазона, в котором зависимость продукции КПГ от концентрации  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  может быть описана линейной функцией (Microsoft Excel 2007, линейный регрессионный анализ).

**Валидация экспериментальной процедуры**

При валидации посчитаны и проанализированы следующие параметры: среднее значение ( $M$ ), стандартное отклонение ( $SD$ ), относительное стандартное отклонение ( $RSD\%$ ), доверительный интервал среднего ( $CI$ ), согласно ранее опубликованным данным [2]. Операции выполняли в пакете программ GraphPad Prism7.0, Statistica 12 и Microsoft Excel 2007.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**Подтверждение значимости катионов меди как определяющего фактора образования КПГ**

Исследование провели согласно описанной экспериментальной процедуре. Был получен набор данных о влиянии трех разных концентраций  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , а также отсутствия таковой на образование флуоресцирующих КПГ (табл. 1).

**Визуальный анализ частотного распределения данных в подгруппах**

Визуальный анализ проведен посредством оценки частотного распределения данных в каждой подгруппе (Statistica 12, «Correspondence Analysis»). В качестве граничных значений при проведении частотного анализа приняты значения бинарных центров, соответствующие уровню флуоресценции 800 (нижняя граница) и 3800 (верхняя граница), превосходящие на 1 расстояние между бинарными центрами экстремальные значения по всей совокупности данных. Шаг между бинарными центрами соответствовал 200 условным единицам флуоресценции (табл. 1).

В группе, где катионы меди отсутствовали, значения флуоресценции группировались вокруг бинарных центров с низким значением флуоресценции КПГ. Увеличение концентрации катионов влекло визуально определяемое повышение уровня флуоресценции. Это позволяет сделать первичное предположение о зависимости скорости реакции гликирования от содержания переходного металла. Отмечено, что концентрация  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  свыше 10 мг/л не производит эффекта, отличного от такового для 10 мг/л. Статистическое описание выборок данных представлено в табл. 1.

Показатели	Концентрация $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , мг/л			
	0	5	10	15
<i>Номер пробы</i>				
1	1499	2247	2695	2841
2	1536	2082	3246	2128
3	1861	2208	2754	2105
4	1470	3064	2371	1715
5	931	1871	3608	2315
6	2135	2187	2327	2374
7	1230	2106	2560	2858
8	1330	2209	2750	2367
9	1286	2058	2368	2349
10	1530	2302	3100	2438
11	919	2117	2497	2277
12	1121	2150	2260	2405
13	1177	2194	2333	2395
14	1465	1910	2294	2311
15	1337	2082	3119	3508
16	1266	2238	2506	2056
17	975	2077	2363	2467
18	1544	2272	2603	2448
19	1369	2266	2314	2635
20	1553	2219	2658	2494
<i>Бинарный центр</i>				
800	0	0	0	0
1000	3	0	0	0
1200	5	0	0	0
1400	6	0	0	0
1600	4	0	0	0
1800	1	1	0	1
2000	0	5	0	1
2200	1	12	2	3
2400	0	1	7	11
2600	0	0	5	1
2800	0	0	2	2
3000	0	1	0	0
3200	0	0	3	0
3400	0	0	0	0
3600	0	0	1	1
3800	0	0	0	0
<i>Параметр</i>				
Медиана	1353,0	2190,5	2533,0	2384,5
Среднее арифметическое	1376,7	2193,0	2636,3	2424,3
Стандартная девиация	296,4	234,4	370,3	361,0
Стандартная ошибка среднего	66,3	52,4	82,8	80,7
Нижний 95%-й доверительный интервал среднего	1238,0	2083,3	2463,0	2255,4
Верхний 95%-й доверительный интервал среднего	1515,4	2302,6	2809,6	2593,2

**Кластерный анализ всей выборки для оценки группировки данных**

С целью проверки гипотезы о статистической значимости фактора присутствия катионов меди при образовании КПГ проведен кластерный анализ всего массива данных методом k-средних (Statistica 12, утилита «k-Means Cluster Analysis»).

Уровни флуоресценции кластеризованы на 4 класса: «0» – минимальный уровень, «1» – низкий уровень, «2» – высокий уровень, «3» – максимальный уровень. Данные проанализированы статистически с применением критерия Хи-квадрат. Установлено наличие статистически значимых различий (степень свободы 73.76, 9; уровень значимости  $p < 0,0001$ ). Это может быть интерпретировано как статистически значимый прирост уровня флуоресцирующих КПГ от подгруппы данных к подгруппе. Данные о распределении частот представлены в табл. 2.

Таблица 2

Распределение частот встречаемости категориальных значений классов при анализе критерием Хи-квадрат

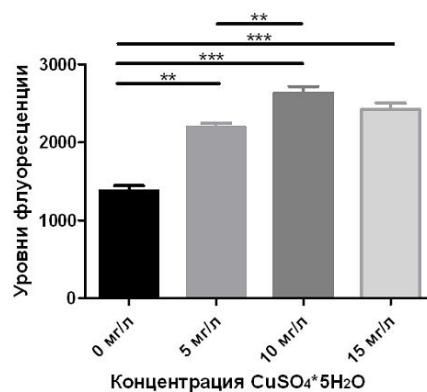
Класс	Концентрация $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , мг/л			
	0	5	10	15
0	11	0	0	0
1	8	2	0	1
2	1	17	12	16
3	0	1	8	3

**Распределение количественных признаков в отдельных подгруппах, выявление статистических различий между подгруппами, проверка линейности**

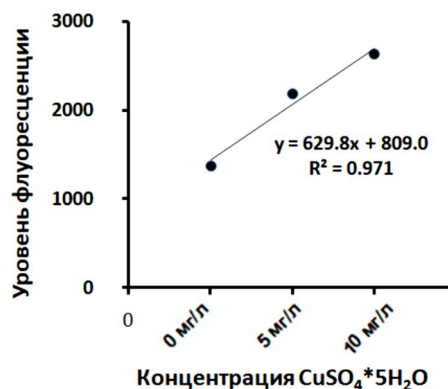
Посредством анализа распределения данных в подгруппах (критерий Колмогорова – Смирнова, критерий Пирсона, критерий Шапиро – Уилка) установлено, что не все группы соответствуют нормальному распределению (первое ограничение к применению ANOVA). Единственная подгруппа, отвечающая требованию нормальности распределения по результату всех трех тестов – подгруппа «0 мг/л». Кроме того, наблюдается неравенство дисперсий генеральной совокупности между выборками с концентрациями 5, 10 и 15 мг/л (второе ограничение к применению ANOVA). Требуется сравнительный анализ выборок с ненормальным распределением данных при неравенстве дисперсий.

Обработка межгрупповых различий проведена с применением критерия Краскела – Уоллиса и пост-тестом Данна. Согласно данным литературы [4], условия применения теста следующие: 1. Все выборки являются случайными выборками из соответствующих им популяций. 2. В дополнение к независимости в каждом образце существует взаимная независимость между различными

образцами. 3. Шкала измерения как минимум порядковая. 4. Либо функции распределения k-популяции идентичны, либо некоторые из популяций имеют тенденцию давать большие значения, чем другие популяции. Характеристики гипотез данного теста: 1. Все функции распределения k-популяции идентичны. 2. Как минимум одна из популяций имеет тенденцию давать большие наблюдения, чем, по крайней мере, одна из популяций. Таким образом, очевидное и оформленное условие к необходимости равенства дисперсий отсутствует, при этом тест является непараметрическим. Результат представлен на рис. А.



А



Б

Рис. А – статистическое сравнение данных между подгруппами (критерий Краскела – Уоллиса, пост-тест Данна,  $p < 0,05$ );  
Б – линейность данных аналитического диапазона

Представленные данные показывают, что имеются статистически значимые различия ряда данных «0 мг/л» с рядами данных «5 мг/л» и «10 мг/л», степень различий которых увеличивается по мере увеличения концентрации  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Концентрация  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  15 мг/л производила эффект, не отличимый от такового для концентрации 10 мг/л. Таким образом, границы 0–10 мг/л являются краевыми точками аналитического диапазона.

Таблица 4

Показатели теста гликоксидации БСА глюкозой в оценке внутрилабораторной воспроизводимости

День	Аналитик	Значения
ДЕНЬ 1	Аналитик 1	2290
		2470
		2482
		2538
	Аналитик 2	2204
		2168
		2396
		2490
ДЕНЬ 2	Аналитик 1	2288
		2312
		2416
		2232
	Аналитик 2	2219
		2325
		2273
		2248
Среднее арифм.		2334,4
SD		115,7
RSD%		4,96

При проверке линейности установлено, что значения средних от выборок данных по концентрациям 0, 5 и 10 мг/л аппроксимируются на линию с высоким значением коэффициента детерминации  $R^2 = 0,971$  (рис. Б).

Учитывая, что значение флуоресценции КПГ в концентрации  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  10 мг/л является максимальным и находится на линейном диапазоне, концентрация 10 мг/л отобрана для дальнейшей процедуры валидации посредством определения показателей сходимости и внутрилабораторной воспроизводимости.

**Определение точности методики**

Точность методики оценена по показателям сходимости и внутрилабораторной воспроизводимости.

**Сходимость**

Сходимость методики была доказана в ходе двух серий по 6 повторностей. Сходимость оценена при следующих условиях: 1) работает один исследователь на одном приборе; 2) используется один метод исследования, реагенты, объект исследования; 3) исследования разделены во времени небольшим промежутком; 4) исследования проводятся в одной лаборатории. Результаты оценки представлены в табл. 3.

Таблица 3

Показатели теста гликоксидации БСА глюкозой в оценке сходимости

Номер повторности	Значения	
	серия 1	серия 2
1	2124	2432
2	2265	2244
3	2248	2420
4	2435	2242
5	2187	2487
6	2159	2367
Среднее арифм.	2236,3	2365,3
SD	110,9	102,2
RSD%	4,96	4,30

Методика считается сходимой, поскольку RSD%, полученное в каждой серии, не превышает целевой величины 5 % для каждой серии проб.

**Внутрилабораторная воспроизводимость**

Внутрилабораторная воспроизводимость методики оценивалась по результатам 16 измерений, полученных двумя аналитиками в два разных дня работы. Внутрилабораторная воспроизводимость определена при следующих условиях: 1) работают разные исследователи; 2) используется одна методика; 3) используется идентичный объект исследования и реагенты. Показатель выражается как RSD%. Условное значение соответствовало  $\leq 5\%$ . Результаты представлены в табл. 4.

Показатель RSD% составляет величину меньше 5 %. Методику можно считать воспроизводимой.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. В результате проделанной работы были настроены условия проведения реакции гликоксидации, при которых фактор концентрации катионов меди (II) определяет интенсивность образования КПГ.

2.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  линейно усиливает образование КПГ в реакции гликоксидации в концентрациях до 10 мг/л. Концентрация 10 мг/л определена как максимально эффективная.

3. Для данной концентрации  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  методика валидирована по показателям сходимости ( $\text{RSD}\% < 5\%$  для двух серий) и воспроизводимости ( $\text{RSD}\% 4,96, < 5\%$ ). Таким образом, методика может считаться точной, пригодной для применения в научно-исследовательской деятельности.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Соколова Е.В., Хохлачева Е.А., Шамшина Д.Д. и др. Активность новых соединений на основе азолазина на моделях оценки антигликирующего действия и ингибирования ДПП-4 // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2019. – № 1 (69). – С. 79–82.  
 2. Шамшина Д.Д., Литвинов Р.А. Валидация методики медь-зависимого аутоокисления аскорбиновой кислоты как способа оценки активности соединений, связывающих d-элементы // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2018. – № 1 (65). – С. 115–117.

3. Cho S.J., Roman G., Yeboah F., Konishi Y. The road to advanced glycation end products: a mechanistic perspective // *CurrMedChem.* – 2007. – No. 14 (15). – P. 1653–1671.
4. Conover W. J. *Practical Nonparametric Statistics.* – 3rd Edition. – 1999. – 592 p.
5. *Diabetes Atlas.* International Diabetes Federation. – 9rd Edition. – 2019. – 29 p.
6. Eid S., Sas K.M., Abcouwer S.F., et al. New insights into the mechanisms of diabetic complications: role of lipids and lipid metabolism // *Diabetologia.* – 2019. – Vol. 62(9). – P. 1539–1549. – doi: 10.1007/s00125-019-4959-1.
7. Savateev K.V., Fedotov V.V., Butorin I., et al. Nitrothiadiazolo[3,2-a]pyrimidines as promising antiglycating agents // *European Journal of Medicinal Chemistry.* – 2020. – Vol. 185. – Art. No. 111808.
8. Serban I.A., Condac E., Costache M., Dinischiotu A. The relationship between ages, Cu<sup>2+</sup> and crosslinking of collagen // *Revue Roumaine de Chimie.* – 2009. – Vol. 54 (1). – P. 93–101.
9. Spasov A.A., Babkov D.A., Sysoeva V.A., et al. 6-nitroazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4h)-ones as antidiabetic agents // *Archiv der Pharmazie.* – 2017. – Vol. 350, no. 12. – Art. No. e1700226.
10. Spasov A.A., Brel A.K., Litvinov R.A., et al. Evaluation of N-hydroxy-, N-methoxy-, and N-acetoxybenzoyl- substituted derivatives of thymine and uracil as new substances for prevention and treatment of long-term complications of diabetes mellitus // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* – 2018. – Vol. 44, no. 6. – C. 769–777.
11. Ramirez Segovia A.S., Wrobel K., Acevedo Aguilar F.J., et al. Effect of Cu (II) on in vitro glycation of human serum albumin by methylglyoxal: a LC-MS-based proteomic approach // *Metallomics.* – 2017. – Vol. 9 (2). – P. 132–140. – doi: 10.1039/c6mt00235h.
12. Yamagishi S., Maeda S., Matsui T., et al. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes // *Biochim Biophys Acta.* – 2012. – No. 1820 (5). – P. 663–671.
13. Ziemann S., Kass D. Advanced glycation end product cross-linking: pathophysiologic role and therapeutic target in cardiovascular disease // *CongestHeartFail.* – 2004. – Vol. 10 (3). – P. 144–149.
2. Shamshina D.D., Litvinov R.A. Validaciya metodiki med'-zavisimogo autookisleniya askorbinovoj kisloty kak sposob ocenki aktivnosti soedinenij, svyazyvayushchih d-elementy [Validation of the ascorbic acid autoxydation metod (copper-induced) as a metod for estimation of evaluation of activity of compounds connecting D-elements]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of Volgograd State Medical University], 2018, no. 1 (65), pp. 115–117. (In Russ.; abstr. in Engl.).
3. Cho S.J., Roman G., Yeboah F., Konishi Y. The road to advanced glycation end products: a mechanistic perspective. *CurrMedChem*, 2007, no. 14 (15), pp. 1653–1671.
4. Conover W. J. *Practical Nonparametric Statistics.* 3rd Edition. 1999. 592 p.
5. *Diabetes Atlas.* International Diabetes Federation. 9 rd Edition. 2019. 29 p.
6. Eid S., Sas K.M., Abcouwer S.F., et al. New insights into the mechanisms of diabetic complications: role of lipids and lipid metabolism. *Diabetologia*, 2019, vol. 62 (9), pp. 1539–1549. doi: 10.1007/s00125-019-4959-1.
7. Savateev K.V., Fedotov V.V., Butorin I., et al. Nitrothiadiazolo[3,2-a]pyrimidines as promising antiglycating agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, vol. 185, art. no. 111808.
8. Serban I.A., Condac E., Costache M., Dinischiotu A. The relationship between ages, Cu<sup>2+</sup> and crosslinking of collagen. *Revue Roumaine de Chimie*, 2009, vol. 54 (1), pp. 93–101.
9. Spasov A.A., Babkov D.A., Sysoeva V.A., et al. 6-nitroazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4h)-ones as antidiabetic agents. *Archiv der Pharmazie*, 2017, vol. 350. no. 12, art. no. e1700226.
10. Spasov A.A., Brel A.K., Litvinov R.A., et al. Evaluation of N-hydroxy-, N-methoxy-, and N-acetoxybenzoyl- substituted derivatives of thymine and uracil as new substances for prevention and treatment of long-term complications of diabetes mellitus. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2018, vol. 44, no. 6, pp. 769–777.
11. Ramirez Segovia A.S., Wrobel K., Acevedo Aguilar F.J., et al. Effect of Cu (II) on in vitro glycation of human serum albumin by methylglyoxal: a LC-MS-based proteomic approach. *Metallomics*, 2017, vol. 9 (2), pp. 132–140. doi: 10.1039/c6mt00235h.
12. Yamagishi S., Maeda S., Matsui T., et al. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. *Biochim Biophys Acta*, 2012, no. 1820 (5), pp. 663–671.
13. Ziemann S., Kass D. Advanced glycation end product cross-linking: pathophysiologic role and therapeutic target in cardiovascular disease. *CongestHeartFail*, 2004, vol. 10 (3), pp. 144–149.

#### REFERENCES

#### Контактная информация

**Литвинов Роман Александрович** – к. м. н., доцент кафедры фармакологии и биоинформатики, с. н. с. лаборатории метаболитных лекарственных средств НЦИЛС, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: litvinov.volggu@mail.ru