

КОЖНАТА АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ КАТО НЕИНВАЗИВЕН МЕТОД ЗА ОЦЕНКА НА НИВАТА НА КРАЙНИ ГЛИКИРАНИ ПРОДУКТИ – КЛИНИЧНА ЗНАЧИМОСТ И ПОВЛИЯВАЩИ ФАКТОРИ

Елица Хаджиева^{1,2}, Мила Бояджиева²

¹Клиника по ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна

²Втора катедра по вътрешни болести, Факултет по медицина,
Медицински университет – Варна

SKIN AUTOFLUORESCENCE AS A CLINICAL TOOL FOR NON-INVASIVE ASSESSMENT OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS—CLINICAL SIGNIFICANCE AND INFLUENCING FACTORS

Elitsa Hadzhieva^{1,2}, Mila Boyadzhieva²

¹Clinic of Endocrinology, St. Marina University Hospital, Medical University of Varna

²Second Department of Internal Diseases, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Крайните продукти на гликиране (AGEs) представляват хетерогенна група съединения, получени чрез неензимно гликиране на свободни аминокрупи в състава на протеини, липиди или нуклеинови киселини. При редица патологични състояния генерирането на гликирани продукти е значително повишено, което провокира голям интерес за търсене на причинно-следствени връзки между AGEs, различни хронични заболявания и техните усложнения. Предвид големите физиологични флукутации на циркулиращите AGEs и липсата на добра възпроизводимост на методите за тяхното изследване от голямо значение се явява възможността за определянето им в тъканите, в които те се свързват необратимо с дълго живеещи протеини. Благодарение на флуоресцентните им свойства, натрупаните в кожата AGEs могат да бъдат измерени чрез кожна автофлуоресценция с помощта на AGE Reader. Тази методика е валидирана в редица клинични изпитвания и се явява лесно приложима и неинвазивна алтернатива на “златния стандарт” за оценка на тъканни AGEs – кожната биопсия. И все пак при използване на AGE Reader трябва да се вземат под внимание ендогенни и екзогенни фактори, които биха ограничили достоверността на изследването, като ос-

ABSTRACT

Advanced glycation end products (AGEs) are heterogeneous compounds derived from nonenzymatic glycation of free amino groups in proteins, lipids, and nucleic acids. Since AGE formation is significantly increased in a number of pathological conditions, there is a huge interest in exploring cause-and-effect relationships between AGEs, various chronic diseases, and their complications. Due to the high physiological fluctuations in circulating AGEs and the lack of good reproducibility of measurement methods, the possibility to assess tissue AGE accumulation is beneficial. Since skin AGEs exhibit fluorescence properties, they can be measured by skin autofluorescence using an AGE Reader. This is a simple and non-invasive technique that has been validated against the gold standard for measuring tissue AGEs (skin biopsies) in a number of clinical trials. However, some endogenous and exogenous factors may limit the reliability of AGE Reader measurements, with special attention being given to skin phototype and some skin care products.

Keywords: advanced glycation end products, AGE Reader, skin autofluorescence

новно значение се отдава на кожния фототип и някои продукти за грижа за кожата.

Ключови думи: крайни гликирани продукти, AGE Reader, кожна автофлуоресценция

ВЪВЕДЕНИЕ

В т.нар. реакция на Maillard неензимно гликиране на протеини, липиди и нуклеинови киселини в различни тъкани и течности с достатъчно концентрация на глюкоза води в началото до формиране на ранни обратими гликирани продукти, които с времето чрез бавно и комплексно преструктуриране се превръщат в крайни продукти на гликирането (AGEs) (58). При нормални физиологични условия AGEs се образуват бавно и скоростта на почистването им от организма е адекватна за предотвратяване на тяхното натрупване (4). От друга страна, при различни заболявания като захарен диабет (ЗД), дислипидемия, сърдечносъдови (СС) заболявания, болест на Алцхаймер, както и редица други състояния, свързани с остър или хроничен оксидативен стрес, формирането им се повишава (8,19,80,92). При бъбречна увреда образуването и натрупването на тъканни AGEs е ускорено вследствие на нарушен бъбречен клирънс (76).

Патогенните ефекти на AGEs са резултат както от свързването им с дълго живеещи молекули, променяйки тяхната структура и функция (директен токсичен ефект), така и от тяхното взаимодействие с рецептора RAGE (54,74). RAGE е мултилиганден рецептор от супер фамилията на трансмембранните имуноглобулини и е повсеместно представен в различни клетъчни типове (24). Взаимодействието AGE-RAGE задейства вътреклетъчни сигнални каскади с последващо повлияване на транскрипцията на редица проинфламаторни гени (66,79). Освен свързани с клетъчната мембрана съществуват и разтворими форми на рецептора (sRAGE), за които се предполага, че имат протективна роля, действайки като рецептори - „примамка“ за AGEs (43).

Спорен остава въпросът кой е най-подходящият метод за оценка на нивата на AGEs и свързаната с тях тъканна увреда. Редица автори предполагат по-малка информативна стойност на плазмените AGEs в сравнение с определянето им на тъканно ниво, тъй като в плазмата те бързо се разпадат до пептиди и/или свободни гликирани продукти с последваща бъбречна екскреция.

Благодарение на флуоресцентните свойства на специфични кожни AGEs методът кожна автофлуоресценция (КАФ) се утвърждава като лесно приложима и неинвазивна алтернатива на „златния стандарт“ кожна биопсия за оценка на нивата на тъканни гликирани продукти (50).

Независимо от многото проучвания, демонстриращи зависимост на КАФ с редица патологични процеси и хронични заболявания (22,59,61,64), резултатите в редица студии относно самостоятелната предиктивна роля на AGEs са разнопосочни. Прилагайки КАФ като неинвазивна техника за измерване на AGEs, особено важно е да се вземат под внимание ендогенни и екзогенни фактори, които биха могли да повлияят достоверността на изследването. Такива са цветът на кожата, някои съпътстващи остри заболявания, използването на слънцезащитни продукти и други.

Формиране на AGEs и тяхната патогенна роля

AGEs представляват хетерогенна група съединения, чието физиологично формиране може да се наблюдава във всички тъкани и телесни течности вследствие на неензимна реакция между карбонилни групи на редуциращи захари и свободни аминокгрупи в състава на протеини, липиди или нуклеинови киселини (58). Тази реакция е описана за първи път през 1912 г. от френския химик Louis Camille Maillard и е известна като реакция на Maillard. Образуването по този начин химически обратими ранни гликирани продукти (Schiff бази и по-стабилните продукти на Amadori) претърпяват с времето допълнително преструктуриране чрез процеси на окисление, редукция и кондензация, водещи до формирането на AGEs. Сред най-ранните примери за изучаване на гликирани продукти в организма е идентифицирането на гликирания хемоглобин, който всъщност представлява продукт на Amadori, получен чрез свързване на глюкоза с N-терминалния валинов остатък на бета-веригата на хемоглобина (69).

При нормални физиологични условия AGEs се образуват бавно и скоростта на почистването

им от организма е адекватна за предотвратяване на тяхното натрупване (4). И все пак известно е, че с напредване на възрастта нивата на гликирани продукти се повишават, което допринася за структурната и функционална увреда на тъканите в процеса на стареене (41,74,85). Освен образувани *in vivo* AGEs произхождат и от екзогенни източници, като тяхната хетерогенност надвишава тази на физиологично формираните. Значим такъв източник са претърпелите топлинна обработка хранителни продукти. Проучвания сред хора и животни установяват значимо отражение на приетите с храната AGEs върху общите нива на циркулиращи гликирани продукти в организма (15,38,84). Предполага се, че ролята на хранителните AGEs нараства при съпътстващо хронично бъбречно заболяване (ХБЗ) поради нарушената им екскреция с урината.

Патологичните ефекти на AGEs са както директни - чрез промяна в структурата и функцията на различни молекули, така и индиректни - опосредствани от свързването им с RAGE (54,74). Предизвиканите промени в дълго живеещи протеини като еластин и колаген например могат да доведат до тяхното натрупване в екстрацелуларния матрикс с последващи нарушения в клетъчните адхезия и растеж (16). С това може да се обясни намалената еластичност на артериалните стени и сърдечните камери, така характерни за процеса на стареене и за заболявания като ЗД (27). Натрупване на AGEs може да се наблюдава и в колагена, изграждащ екстрацелуларния матрикс на бъбрека, с последваща структурна и функционална увреда на базалната гломерулна мембрана (31). Неензимното гликиране на органичния костен матрикс пък крие потенциален риск за нарушения в процеса на костно ремоделиране, както и за промяна в костната сила и здравина (5,73).

Освен описаните директни ефекти на AGEs последните могат да се намесят във вътреклетъчната сигнализация и генната експресия, като по този начин да стимулират продукцията на проинфламаторни цитокини, растежни фактори, адхезионни молекули и свободни кислородни радикали (66). Това е възможно благодарение на взаимодействието на AGEs със специфични рецептори на клетъчната повърхност, най-добре изученият сред които е RAGE. От друга страна, съществуват и рецептори, отговорни за „обезвреждане“ на гликираните продукти чрез ендоцитоза и вътреклетъчно разграждане (63). Тяхната експресия е различна в различните клетки и тъкани и се модулира в зависимост от натовар-

ването с AGEs, съпътстващи метаболитни нарушения и състояния като стареене, хиперлипидемия, ЗД (89).

При здрави индивиди се наблюдава връзка между серумните нива на гликирани продукти и наличието на рискови фактори за различни хронични заболявания (15,38,85). От друга страна, нараства и броят на проучванията, които потвърждават зависимост между AGEs и редица болестни състояния като затлъстяване, ЗД, бъбречни и СС заболявания, остеопороза, ревматоиден артрит, когнитивни нарушения и злокачествени заболявания (10,11,29,31,33,44,93). И все пак често са налице противоречиви резултати в различните студии. Възможна причина за това е голямото разнообразие от циркулиращи AGEs с различен афинитет към свързващите ги рецептори и вероятно различен физиологичен отговор, липсата на унифицирани методи за тяхното изследване и измерването на различни гликирани продукти в различните проучвания. Още повече спорен остава въпросът за причинно-следствената връзка - дали кумулирането на гликирани продукти е важен фактор в патогенезата на различни заболявания, или се явява само следствие от тях.

Неинвазивна оценка на кожната флуоресценция

Предвид значимата хетерогенност на циркулиращите AGEs, големите им физиологични флукутации, високата цена и липсата на добра възпроизводимост на методите за тяхното изследване, от голямо значение се явява възможността за определянето им в тъканите (18). Още повече че в по-голямата си част гликираните продукти се формират вътреклетъчно или се свързват с вътреклетъчни протеини или съставни части на интерстициума, поради което се счита, че плазмените AGEs не са адекватен показател за тъканното съдържание на гликирани продукти. В допълнение нивото на AGEs в плазмата се влияе от моментната бъбречна и чернодробна функция, определяща техния клирънс.

За разлика от биологични материали като кръв и урина за изследване на AGEs повечето тъканни проби са труднодостъпни. Изключение прави кожата, още повече че тя е сред тъканите с високо съдържание на дълго живеещи протеини, с които гликираните продукти се свързват необратимо. Предвид високата цена и инвазивност на кожната биопсия като „златен стандарт“ за оценка на кумулираните в кожата AGEs в днешно време се разчита на разработените методи за неинвазивното им изследване чрез КАФ.

Това е възможно благодарение на способността на повечето AGEs да флуоресцират.

Известни са два вида устройства за неинвазивно измерване на кожна флуоресценция - автофлуоресцентен AGE Reader (DiagnOptics™, Холандия) и SCOUT DS SF спектрометър (VeraLight, САЩ), като според наличната към момента информация последният е вече извън производство (25). Трябва да се има предвид, че техниките на изследване се различават и получените стойности не подлежат на директно сравнение. Изследваната чрез AGE Reader кожна флуоресценция се означава като КАФ, а измерената чрез SCOUT спектрометър – като вътрешна флуоресценция на кожата. Бързо и неинвазивно измерване на свързани с тъканите AGEs е възможно и в структури на окото - роговица и очна леща, с помощта на флуорофотометър (Fluorotron™, OcuMetrics, Mountain View, САЩ) (40).

AGE reader, произведен от холандската компания Diagnoptics, е първият използван в клиничната практика апарат за неинвазивно определяне на тъканни AGEs (50). Както се спомена, методът залага на флуоресцентните свойства на редица гликирани продукти и е валидиран със „златния стандарт“ кожна биопсия (18,50,51). Под флуоресценция се разбира свойството на веществата и тъканите да излъчват светлина при възбуждането им със светлинни кванти. AGE reader съдържа лампа, излъчваща UV-A лъчи с пикова дължина на вълната 360-370 nm, и спектрофотометър. Устройството се поставя на воларната повърхност на доминантната предмишница, като се подбира зона с интактна кожа, която е била минимално изложена на слънчева светлина. Осветяването с UV-A лъчи възбужда кожните AGEs с характерни автофлуоресцентни свойства в честотния диапазон 300-420 nm. Полученият флуоресцентен сигнал се отчита от спектрофотометъра в спектралния диапазон 300-600 nm и се представя на екрана на устройството като стойност на КАФ заедно с коригирани спрямо възрастта референтни граници. КАФ се измерва в т.нар. арбитарни (произволни) единици (AU) като съотношение между интензитета на флуоресцентната светлина и този на възбуждащите UV-A лъчи, умножено по 100 с оглед компенсиране ефекта на кожната пигментация върху автофлуоресценцията чрез поглъщане на светлина. Обичайно за всяка стойност на КАФ се провеждат три последователни измервания в три различни участъка на предмишницата, в интервал от около две минути (18,52).

През 2004 г. се появяват първите данни за съпоставимост между неинвазивно и инвазивно измерената КАФ при диабетици и здрави контроли (50). Още повече, установена е директна корелация на оценената чрез AGE Reader КАФ не само с флуоресциращите AGEs в екстракти от кожна биопсия (напр. пентозидин), но и с тези кожни гликирани продукти, които не проявяват флуоресцентни свойства (напр. карбоксиметил-лизин, карбоксиетил-лизин) (37,50-52).

Клинично приложение на КАФ

Непрекъснато нараства броят на публикациите относно връзката между КАФ и различни патологични състояния. Най-ранни и многобройни са изследванията в областта на ЗД - класическия пример за ускорено формиране и натрупване на AGEs. В срезово проучване от типа случай-контрола са измерени значително по-високи стойности на КАФ при пациенти с тип 2 ЗД (Т2ЗД) със задоволителен гликемичен контрол в сравнение със здрави лица във всички възрастови групи (56). Първият систематичен обзор, посветен на връзката между КАФ, измерена чрез AGE Reader, и наличието на хронични диабетни усложнения сред пациенти с тип 1 (Т1) и Т2ЗД в Европа, е изготвен от Vos и съавт. през 2011 г. Авторите установяват позитивна асоциация между КАФ и едно или повече диабетни усложнения с изключение на диабетната ретинопатия (ДР) (14). Посочените зависимости се потвърждават и в по-скорошни публикации, някои от които с участници от азиатски произход, като в част от студиите КАФ корелира и с наличието на ДР (1,6,7,12,30,34,36,62,65,70,81,82,83,90,91,94,95). Ето защо КАФ се превръща в потенциален сурогатен маркер за неблагоприятните последици в условия на хронична хипергликемия и повишен оксидативен стрес. Освен връзка на КАФ с диабетните усложнения налице са и доказателства относно предиктивната роля на кожните гликирани продукти за бъдещо развитие на Т2 ЗД (78,87,126).

Все повече проучвания установяват зависимост между КАФ и нежелани СС събития както при диабетици (47,80,96), така и при лица с известно ХБЗ (75,88). Още повече, налице са проспективни студии, които посочват КАФ като независим рисков фактор за смъртност сред пациенти със ЗД, ХБЗ и периферна артериална болест (13,21,53,75). Meerwaldt и съавт. (2007 г.) например установяват стойност на КАФ >2.0 AU, измерена чрез AgeReader, като значим предиктор за СС риск и смъртност при 5-годишно проследяване на пациенти с Т1 и Т2ЗД (53). В потвърж-

дение на прогностичната стойност на КАФ са и резултатите от наскоро публикувано мащабно популационно базирано проучване сред лица с Т23Д (13). Изследователите посочват значима зависимост между изходно установената КАФ и бъдещи СС събития и смъртност. Интерес представлява фактът, че предиктивната роля на КАФ се оказва по-голяма от тази на серумния холестерол или нивата на артериално налягане в посоченото научно изследване (13).

Фактори, повлияващи КАФ

С оглед подобряване надеждността на получените резултати трябва да се имат предвид редица фактори, повлияващи неинвазивното измерване на КАФ чрез AGE Reader. На първо място това са **кожни фактори** - дебелина на епидермиса, но най-вече съдържание на други флуоресциращи съединения, различни от AGEs (напр. никотинамид аденин динуклеотид, кератин, вит. Д и др. флуорофори), както и наличие на съединения с хромофорни групи (меланин, оксигемоглобин, билирубин, колаген и др.), които подобно на флуорофорите абсорбират и излъчват светлина, но излъчваната от тях светлина е само във видимия диапазон (9,18). И все пак използваните от AGE Reader възбуждащи UV-A лъчи са подбрани с такава дължина, че за получените стойности на КАФ да допринасят предимно флуоресциращите AGEs. Потвърждение за това идва от метаанализ на три валидиращи проучвания, които посочва, че съдържанието на кожни гликирани продукти допринася за основната част (до 76%) от дисперсията в нивата на КАФ (20,50,51).

Цветът на кожата е основен фактор, повлияващ КАФ, и винаги трябва да се има предвид при използването на AGE Reader. В резултат от по-високото съдържание на меланин силно пигментираната кожа абсорбира в по-голяма степен излъчените от устройството лъчи и съответно отразява значително по-малко от тях. Както вече се спомена, измерването на КАФ се извършва на воларната повърхност на предмишницата – област от тялото с минимално зависима от сезона промяна в пигментацията. Скалата на Fitzpatrick представлява полуколичествена класификация за оценка на цвета на кожата чрез кожния отговор при облъчване с UV лъчи (18,41,42,71). Т.нар. процент на кожно отразяване (skin reflectance percentage, SR%) се калкулира автоматично и позволява надеждно изследване на КАФ независимо от цвета на кожата в случаите, когато SR% е в интервала между 6 и 10% (кожен фототип клас I–IV по скалата на Fitzpatrick). От друга страна, SR <6% (тъмни типове кожа, Fitzpatrick клас V–VI) означава,

че >94% от UV светлина е абсорбирана в кожата, което значително повишава риска от фалшиво ниски стойности на измерената КАФ (18,55). Следователно насърчаването на клинични изследвания с AGE Reader сред тъмнокожи е от голямо значение с оглед бъдеща възможност за широко и надеждно приложение на КАФ и при лица с ниски стойности на SR.

Многобройни са клиничните изпитвания, посветени на различията в нивата на КАФ при лица с различна **етническа принадлежност**. Koetsier и съавт. (2010 г.) например предлагат референтни стойности на КАФ за представители от кавказката раса (41), а година по-късно Yue и съавт. (2011 г.) – за китайската популация (97). Такива научни изследвания са провеждани и в други азиатски страни, както и сред лица от арабския свят (3,55). И все пак сравнение на тези проучвания е трудно предвид многобройни фактори - различия в моделите на AGE Reader, използвани в различните студии, интериндивидуални вариации в типа на кожата и др. Поради това не етническата принадлежност, а кожният фототип следва да се има предвид при неинвазивното измерване на КАФ с AGE Reader.

Както се спомена, измерената чрез AGE Reader КАФ дава предимно дългосрочна ретроспективна информация за свързаните с дълго живеещи протеини кожни гликирани продукти, а не за остри колебания в плазмените им нива. И все пак би могло да се допусне потенциално влияние върху КАФ от страна на подкожната капилярна мрежа и интерстициум чрез кръвните AGEs и други флуорофори. Това предполага, че и по-скорошни промени в нивата на AGEs биха могли да се отразят върху КАФ (9). Добре известна е ролята на **острите и хроничните заболявания** за индуциране на оксидативен стрес (45). По темата са проведени редица проучвания, като резултатите са разнопосочни (49,57,68). Екстремни **физически натоварвания** също могат да повлияят нивата на оксидативен стрес чрез повишено образуване на реактивни кислородни радикали (РКР) (45,67). От друга страна, регулярната физическа активност способства за понижаване формирането на РКР (67) и следователно има потенциална благоприятна роля за предотвратяване натрупването на AGEs. Редица проучвания посочват обратна зависимост между високи нива регулярна физическата активност и КАФ (17,23,35), докато в други студии връзка между двете не е намерена (32,39,72). Доколкото ни е известно, липсват научни изследвания относно директния ефект на физическата активност върху КАФ.

Известни са ползите за хранителната индустрия от по-високото съдържание на гликирани продукти – по-голяма трайност, подобрен вкус, цвят и външен вид на консумираната храна. Нивата на AGEs намаляват при по-ниска температура на готвене. Относително високо е съдържанието на AGEs в **храните** от животински произход, както и в храните, богати на мазнини и протеини. Така например Kellow и съавт. (2018 г.) намират положителна зависимост между приема на месо и месни продукти и нивата на КАФ (39). От друга страна, установено е, че във въглехидратните храни като плодове, зеленчуци, мляко и пълнозърнести култури, независимо от термичната им обработка, нивата на AGEs са ниски (86). Sanchez и съавт. (2020 г.) докладват, че придържането към средиземноморска диета се свързва с по-ниски стойности на КАФ (72). За разлика от дългосрочните ефекти на различни хранителни режими и навизи директният ефект на приема на храна върху последващо измерване на КАФ остава спорен (48,77). Stirban и съавт. (2008 г.) например установяват статистически значимо постпрандиално повишаване на измерената чрез AGE Reader КАФ при изследвани 21 лица от кавказката раса със и без ЗД (77).

Важен екзогенен фактор, повлияващ КАФ, е използването на различни **продукти за грижа за кожата** вероятно поради флуоресцентните характеристики на някои кремове. В проучване на Noordzij и съавт. (2011 г.) прилагането на дневен крем, слънцезащитни продукти и автобронзанти в областта на предмишницата води до покачване с >100% на КАФ в сравнение с 18% повишение след използване на лосион за тяло (60). Още повече че ефектът върху стойностите на КАФ е продължителен и само частично обратим след почистване на кожата със спирт или измиване със сапун и вода (2,60). Поради това препоръките при използване на AGE Reader са да не се измерва КАФ за период от поне два дена след прилагане на продукти за изкуствен тен в областта на предмишницата (18). В същото проучване е проследено и влиянието на предизвикана кожна вазоконстрикция и вазодилатация – вазоконстрикцията повишава нивата на КАФ, а вазодилатацията има противоположен ефект (60).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Непрекъснато нараства броят на публикациите, посветени на връзката между AGEs и различни патологични състояния. Способността на AGEs за необратимо свързване с белтъци определя натрупването на гликирани продукти в тъка-

ни с високо съдържание на дълго живеещи протеини, каквито например са кожният колаген и еластин. КАФ, измерена чрез AGE Reader, е утвърдена като бърза, лесно приложима и неинвазивна техника за оценка на кумулиралите в кожата AGEs. Методът е валидиран със „златния стандарт“ кожна биопсия както при диабетици и пациенти на хемодиализа, така и при здрави контроли (37,50,51,56). Научни изследвания разкриват предиктивната роля на КАФ за бъдещо развитие на Т2ЗД, СС заболявания и смъртност сред общата популация (87) и я посочват като рисков фактор за смъртност сред лица със ЗД, ХБЗ и периферна артериална болест (13,21,25,28,53,75). Следователно КАФ има потенциално значение за превенцията на хронични заболявания и техните усложнения, за което са необходими повече проспективни проучвания.

Широко се обсъжда възможната роля на ендогенни и екзогенни фактори за повлияване достоверността на изследването чрез AGE Reader. Както стана ясно, особено значение се отдава на цвета на кожата и използването на слънцезащитни кремове и продукти за изкуствен тен (2,18,60). От друга страна, спорно е влиянието върху КАФ на остри колебания в нивата на плазмените AGEs в резултат например на остро заболяване или екстремно физическо натоварване (17,23,32,35,39,45,49,57,68,72,67).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahdi M, Gerdes VE, Graaff R, Kuipers S, Smit AJ, Meesters EW. Skin autofluorescence and complications of diabetes: does ethnic background or skin color matter? *Diabetes Technol Ther.* 2015;17(2):88-95
2. Ahmad MS, Damanhoury ZA, Kimhofer T, Mosli HH, Holmes E. A new gender-specific model for skin autofluorescence risk stratification. *Sci Rep.* 2015;5:10198.
3. Ahmad MS, Kimhofer T, Ahmad S, AlAma MN, Mosli HH, Hindawi SI, et al. Ethnicity and skin autofluorescence-based risk-engines for cardiovascular disease and diabetes mellitus. *PLoS One.* 2017;12(9):e0185175.
4. Ahmed N. Advanced glycation endproducts–role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2005;67(1):3-21.
5. Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, et al. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone.* 2007;40:345–53
6. Araszkievicz A, Naskret D, Niedzwiecki P, Samborski P, Wierusz-Wysocka B, Zozulinska-

- Ziolkiewicz D. Increased accumulation of skin advanced glycation end products is associated with microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 2011;13(8):837-42
7. Araszkiwicz A, Naskret D, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Pilacinski S, Uruska A, Grzelka A, et al. Skin autofluorescence is associated with carotid intima-media thickness, diabetic microangiopathy, and longlasting metabolic control in type 1 diabetic patients. Results from Poznan Prospective Study. *Microvasc. Res.* 2015;98:62-7.
 8. Arsov S, Graaff R, van Oeveren W, Stegmayr B, Sikole A, Rakhorst G, et al. Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52:11-20
 9. Atzeni IM, van de Zande SC, Westra J, Zwerver J, Smit AJ, Mulder DJ. The AGE reader: a non-invasive method to assess long term tissue damage. *Methods.* 2022;203:533-541
 10. Bakker SF, Tushuizen ME, Gozutok E, Ciftci A, Gelderman KA, Mulder CJ, et al. Advanced glycation end products (AGEs) and the soluble receptor for AGE (sRAGE) in patients with type 1 diabetes and coeliac disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015;25:230-5.
 11. Baumann M. Role of advanced glycation end products in hypertension and cardiovascular risk: human studies. *J Am Soc Hypertens.* 2012;6:427-35.
 12. Bentata R, Cougnard-Grégoire A, Delyfer MN, Delcourt C, Blanco L, Pupier E, et al. Skin autofluorescence, renal insufficiency and retinopathy in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complicat.* 2017;31:619-23
 13. Boersma HE, van Waateringe RP, van der Klauw MM, Graaff R, Paterson AD, Smit AJ, et al. Skin autofluorescence predicts new cardiovascular disease and mortality in people with type 2 diabetes. *BMC Endocr Disord.* 2021;21(1):14.
 14. Bos DC, de Ranitz-Greven WL, de Valk HW. Advanced glycation end products, measured as skin autofluorescence and diabetes complications: a systematic review. *Diabetes Technol Ther.* 2011;13(7):773-9.
 15. Cai W, He JC, Zhu L, Chen X, Zheng F, Striker GE, et al. Oral glycotoxins determine the effects of calorie restriction on oxidant stress, age-related diseases, and lifespan. *Am J Pathol.* 2008;173:327-36.
 16. Charonis AS, Reger LA, Dege JE, Kouzi-Koliakos K, Furcht LT, Wohlhueter RM, et al. Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. *Diabetes.* 1990;39:807-14.
 17. Couppé C, Svensson RB, Grosset JF, Kovanen V, Nielsen RH, Olsen MR, et al. Life-long endurance running is associated with reduced glycation and mechanical stress in connective tissue. *Age (Dordr).* 2014;36(4):9665.
 18. Da Moura Semedo C, Webb M, Waller H, Khunti K, Davies M. Skin autofluorescence, a non-invasive marker of advanced glycation end products: clinical relevance and limitations. *Postgrad Med J.* 2017;93:289-94.
 19. Del Turco S, Basta G. An update on advanced glycation endproducts and atherosclerosis. *Biofactors.* 2012;38:266-74
 20. den Hollander NC, Mulder DJ, Graaff R, Thorpe SR, Baynes JW, Smit GP, et al. Advanced glycation end products and the absence of premature atherosclerosis in glycogen storage disease Ia. *J Inher Metab Dis.* 2007;30(6):916-23
 21. de Vos LC, Mulder DJ, Smit AJ, Dullaart RP, Kleefstra N, Lijfering WM, et al. Skin autofluorescence is associated with 5-year mortality and cardiovascular events in patients with peripheral artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(4):933-8.
 22. de Vos LC, Lefrandt JD, Dullaart RP, Zeebregts CJ, Smit AJ. Advanced glycation end products: An emerging biomarker for adverse outcome in patients with peripheral artery disease. *Atherosclerosis.* 2016;254:291-299.
 23. Duda-Sobczak A, Falkowski B, Araszkiwicz A, Zozulinska-Ziolkiewicz D. Association Between Self-reported Physical Activity and Skin Autofluorescence, a Marker of Tissue Accumulation of Advanced Glycation End Products in Adults With Type 1 Diabetes: A Cross-sectional Study. *Clin Ther.* 2018;40(6):872-880.
 24. Falcone C, Bozzini S, D'Angelo A, Matrone B, Colonna A, Benzi A, et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary atherosclerosis: possible correlation with clinical presentation. *Dis Markers.* 2013;35(3):135-40.
 25. Fokkens BT, Smit AJ. Skin fluorescence as a clinical tool for non-invasive assessment of advanced glycation and long-term complications of diabetes. *Glycoconj J.* 2016;33(4):527-535.
 26. Fokkens BT, van Waateringe RP, Mulder DJ, Wolffenbuttel BHR, Smit AJ. Skin autofluorescence improves the Finnish Diabetes Risk Score in the detection of diabetes in a large population-based cohort: the LifeLines Cohort Study. *Diabetes Metab.* 2018;44(5):424-430
 27. Forbes JM, Soldatos G, Thomas MC. Below the radar: advanced glycation end products that detour "around the side": is HbA(1c) not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? *Clin Biochem Rev.* 2005;26:123-34.
 28. Fraser SD, Roderick PJ, McIntyre NJ, Harris S, McIntyre CW, Fluck RJ, et al. Skin

- autofluorescence and all-cause mortality in stage 3 CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(8):1361-8.
29. Gaens KH, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Advanced glycation endproducts and its receptor for advanced glycation endproducts in obesity. *Curr Opin Lipidol*. 2013;24:4-11
 30. Genevieve M, Vivot A, Gonzalez C, Raffaitin C, BarbergerGateau P, Gin H, et al. Skin autofluorescence is associated with past glycaemic control and complications in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab*. 2013;39(4):349-54.
 31. Gugliucci A, Menini T. The axis AGE-RAGE-soluble RAGE and oxidative stress in chronic kidney disease. *Adv Exp Med Biol*. 2014;824:191-208.
 32. Hansen AL, Carstensen B, Helge JW, Johansen NB, Gram B, Christiansen JS, et al; ADDITION-Denmark Steering Committee. Combined heart rate- and accelerometer-assessed physical activity energy expenditure and associations with glucose homeostasis markers in a population at high risk of developing diabetes: the ADDITION-PRO study. *Diabetes Care*. 2013;36(10):3062-9.
 33. Heier M, Margeirsdottir HD, Torjesen PA, Seljeflot I, Stensaeth KH, Gaarder M, et al. The advanced glycation end product methylglyoxal-derived hydroimidazolone-1 and early signs of atherosclerosis in childhood diabetes. *Diab Vasc Dis Res*. 2015;12:139-45.
 34. Hirano T, Iesato Y, Toriyama Y, Imai A, Chiba D, Murata T. Correlation between diabetic retinopathy severity and elevated skin autofluorescence as a marker of advanced glycation end-product accumulation in type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications*. 2014;28(5):729-34.
 35. Hjerrild JN, Wobbe A, Stausholm MB, Larsen AE, Josefsen CO, Malmgaard-Clausen NM, et al. Effects of Long-Term Physical Activity and Diet on Skin Glycation and Achilles Tendon Structure. *Nutrients*. 2019;11(6):1409.
 36. Hu H, Han CM, Hu XL, Ye WL, Huang WJ, Smit AJ. Elevated skin autofluorescence is strongly associated with foot ulcers in patients with diabetes: a cross-sectional, observational study of Chinese subjects. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2012;13:372-7.
 37. Hu H, Jiang H, Zhu L, Wu X, Han C. Accumulation of Advanced Glycation Endproducts and Subclinical Inflammation in Deep Tissues of Adult Patients With and Without Diabetes. *Can J Diabetes*. 2018;42(5):525-532.e4.
 38. Kellow NJ, Savage GS. Dietary advanced glycation end-product restriction for the attenuation of insulin resistance, oxidative stress and endothelial dysfunction: a systematic review. *Eur J Clin Nutr*. 2013;67:239-48.
 39. Kellow NJ, Coughlan MT, Reid CM. Association between habitual dietary and lifestyle behaviours and skin autofluorescence (SAF), a marker of tissue accumulation of advanced glycation endproducts (AGEs), in healthy adults. *Eur J Nutr*. 2018;57(6):2209-2216.
 40. Kessel L, Hougaard JL, Sander B, Kyvik KO, Sørensen TI, Larsen M. Lens ageing as an indicator of tissue damage associated with smoking and non-enzymatic glycation-a twin study. *Diabetologia*. 2002;45(10):1457-62
 41. Koetsier M, Lutgers HL, de Jonge C, Links TP, Smit AJ, Graaff R. Reference values of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther*. 2010;12:399-403.
 42. Koetsier M, Nur E, Chunmao H, Lutgers HL, Links TP, Smit AJ, et al. Skin color independent assessment of aging using skin autofluorescence. *Opt Express*. 2010;18(14):14416-29.
 43. Koutroumani N, Partsalaki I, Lamari F, Dettoraki A, Gil AP, Karvela A, et al. Protective mechanisms against oxidative stress and angiopathy in young patients with diabetes type 1 (DM1). *J Pediatr Endocrinol Metab* 2013;26(3-4):309-17.
 44. Kuhla A, Ludwig SC, Kuhla B, Munch G, Vollmar B. Advanced glycation end products are mitogenic signals and trigger cell cycle reentry of neurons in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging*. 2015;36:753-61
 45. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757-772.
 46. Lutgers HL, Graaff R, Links TP, Ubink-Veltmaat LJ, Bilo HJ, Gans RO, et al. Skin autofluorescence as a noninvasive marker of vascular damage in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29(12):2654-9
 47. Lutgers HL, Gerrits EG, Graaff R, Links TP, Sluiter WJ, Gans RO, et al. Skin autofluorescence provides additional information to the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) risk score for the estimation of cardiovascular prognosis in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2009;52(5):789-97
 48. Maynard JD, Rohrscheib M, Way JF, Nguyen CM, Ediger MN. Noninvasive type 2 diabetes screening: superior sensitivity to fasting plasma glucose and A1C. *Diabetes Care*. 2007;30(5):1120-4.
 49. Meertens JH, Nienhuis HL, Lefrandt JD, Schalkwijk CG, Nyssönen K, Ligtenberg JJ, et al. The Course of Skin and Serum Biomarkers of Advanced Glycation Endproducts and Its Association with Oxidative Stress, Inflammation, Disease Severity, and Mortality during ICU Admission in Critically Ill Patients: Results from a Prospective Pilot Study. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160893.
 50. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PH, Links TP, Jager JJ, Alderson NL, et al. Simple non-invasive

- assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia*. 2004;47(7):1324-1330
51. Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, Huisman RJ, Links TP, den Hollander NC, et al. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:3687-93
 52. Meerwaldt R, Links T, Graaff R, Thorpe SR, Baynes JW, Hartog J, et al. Simple noninvasive measurement of skin autofluorescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:290-8.
 53. Meerwaldt R, Lutgers HL, Links TP, Graaff R, Baynes JW, Gans RO, et al. Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30: 107-112
 54. Miranda ER, Fuller KNZ, Perkins RK, Beisswenger PJ, Farabi SS, Quinn L, et al. Divergent Changes in Plasma AGEs and sRAGE Isoforms Following an Overnight Fast in T1DM. *Nutrients*. 2019;11(2):386.
 55. Mook-Kanamori MJ, Selim MM, Takiddin AH, Al-Homsi H, Al-Mahmoud KA, Al-Obaidli A, et al. Ethnic and gender differences in advanced glycation end products measured by skin auto-fluorescence. *Dermatoendocrinol*. 2013;5(2):325-30.
 56. Mulder DJ. Skin autofluorescence in cardiovascular disease: a non-invasive Approach for assessing inflammatory and oxidative stress. University of Groningen; 2007.p.153
 57. Mulder DJ, van Haelst PL, Graaff R, Gans RO, Zijlstra F, Smit AJ. Skin autofluorescence is elevated in acute myocardial infarction and is associated with the one-year incidence of major adverse cardiac events. *Neth Heart J*. 2009;17(4):162-8.
 58. Nakamura K, Nakazawa Y, Ienaga K. Acid-stable fluorescent advanced glycation end products: vesperlysines a, B, and C are formed as crosslinked products in the Maillard reaction between lysine or proteins with glucose. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1997;232(1):227-30.
 59. Nienhuis HL, de Leeuw K, Bijzet J, Smit A, Schalkwijk CG, Graaff R, et al. Skin autofluorescence is increased in systemic lupus erythematosus but is not reflected by elevated plasma levels of advanced glycation end products. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47:1554-1558
 60. Noordzij MJ, Lefrandt JD, Graaff R, Smit AJ. Dermal factors influencing measurement of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther*. 2011;13(2):165-70.
 61. Noordzij MJ, Lefrandt JD, Loeffen EAH, Saleem BR, Meerwaldt R, Lutgers HL, et al. Skin autofluorescence is increased in patients with carotid artery stenosis and peripheral artery disease. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2012;28:431-438.
 62. Noordzij MJ, Mulder DJ, Oomen PH, Brouwer T, Jager J, Castro Cabezas M, et al. Skin autofluorescence and risk of micro- and macrovascular complications in patients with Type 2 diabetes mellitus-a multi-centre study. *Diabet Med*. 2012;29(12):1556-61.
 63. Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, et al. CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;947:350-5
 64. Oleniuc M, Schiller A, Secara I, Onofriescu M, Hogas S, Apetrii M, et al. Evaluation of advanced glycation end products accumulation, using skin autofluorescence, in CKD and dialysis patients. *Int Urol Nephrol*. 2012;44(5):1441-9.
 65. Osawa S, Katakami N, Sato I, Ninomiya H, Omori K, Yamamoto Y, et al. Skin autofluorescence is associated with vascular complications in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complicat*. 2018;32:839-44.
 66. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol*. 2014;2:411-29
 67. Pingitore A, Lima GP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*. 2015;31(7-8):916-22.
 68. Pol HW, Sibma E, Zeebregts CJ, Pierik EG, Meerwaldt R. Increased skin autofluorescence after colorectal operation reflects surgical stress and postoperative outcome. *Am J Surg*. 2011;202(5):583-9.
 69. Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HM. Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1969;36:838-43.
 70. Rajaobelina K, Farges B, Nov S, Maury E, Cephise-Velayoudom FL, Gin H, et al. Skin autofluorescence and peripheral neuropathy four years later in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2017;33:e2832
 71. Sachdeva S. Fitzpatrick skin typing: applications in dermatology. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol*. 2009;75:93-96.
 72. Sánchez E, Betriu À, Salas-Salvadó J, Pamplona R, Barbé F, Purroy F, et al; ILERVAS project investigators. Mediterranean diet, physical activity and subcutaneous advanced glycation end-products' accumulation: a cross-sectional analysis in the ILERVAS project. *Eur J Nutr*. 2020;59(3):1233-1242.
 73. Sanguineti R, Storace D, Monacelli F, Federici A, Odetti P. Pentosidine effects on human osteoblasts in vitro. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1126:166-72

74. Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2010;65(9):963-75.
75. Shardlow A, McIntyre NJ, Kolhe NV, Nellums LB, Fluck RJ, McIntyre CW, et al. The association of skin autofluorescence with cardiovascular events and all-cause mortality in persons with chronic kidney disease stage 3: A prospective cohort study. *PLoS Med.* 2020;17(7): e1003163
76. Stingham AE, Massy ZA, Vlassara H, Striker GE, Boullier A. Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(2):354-70
77. Stirban A, Nandrea S, Negrea M, Koschinsky T, Tschoepe D. Skin autofluorescence increases postprandially in human subjects. *Diabetes Technol Ther.* 2008;10(3):200-5.
78. Stirban A. Noninvasive skin fluorescence spectroscopy for diabetes screening. *J Diabetes Sci Technol.* 2013;7(4):1001-1004.
79. Stirban A, Gawlowski T, Roden M. Vascular effects of advanced glycation endproducts: clinical effects and molecular mechanisms. *Mol Metab.* 2014;3:94-108
80. Stirban A, Heinemann L. Skin autofluorescence - a non-invasive measurement for assessing cardiovascular risk and risk of diabetes. *Eur Endocrinol.* 2014;10:106-10.
81. Stirban AO, Bondor CI, Florea B, Veresiu IA, Gavan NA. Skin autofluorescence: correlation with measures of diabetic sensorimotor neuropathy. *J Diabetes Complicat.* 2018;32:851-6.
82. Sugisawa E, Miura J, Iwamoto Y, Uchigata Y. Skin autofluorescence reflects integration of past long-term glycemic control in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2013;36(8):2339-45.
83. Tanaka K, Tani Y, Asai J, Nemoto F, Kusano Y, Suzuki H, et al. Skin autofluorescence is associated with severity of vascular complications in Japanese patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2012;29(4):492-500.
84. Uribarri J, Peppas M, Cai W, Goldberg T, Lu M, Baliga S, et al. Dietary glycotoxins correlate with circulating advanced glycation end product levels in renal failure patients. *Am J Kidney Dis.* 2003;42:532-8
85. Uribarri J, Cai W, Peppas M, Goodman S, Ferrucci L, Striker G, et al. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007;62:427-33.
86. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc.* 2010;110:911-6 e91
87. van Waateringe RP, Fokkens BT, Slagter SN, van der Klauw MM, van Vliet-Ostapchouk JV, Graaff R, et al. Skin autofluorescence predicts incident type 2 diabetes, cardiovascular disease and mortality in the general population. *Diabetologia.* 2019;62(2):269-280
88. Viramontes Hörner D, Taal MW. Skin autofluorescence: an emerging biomarker in persons with kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2019;28(6):507-512.
89. Vlassara H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev.* 2001;17:436-43
90. Vouillarmet J, Maucourt-Boulch D, Michon P, Thivolet C. Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence: a new marker of diabetic foot ulceration. *Diabetes Technol Ther.* 2013;15:601-5
91. Wan L, Qin G, Yan W, Sun T. Skin autofluorescence is associated with diabetic peripheral neuropathy in chinese patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2019;23:387-92.
92. Wautier MP, Tessier FJ, Wautier JL. Advanced glycation end products: a risk factor for human health. *Ann Pharm Fr.* 2014;72:400-8
93. Yamagishi S, Matsui T, Fukami K. Role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligands in Cancer risk. *Rejuvenation Res.* 2015;18:48-56
94. Yasuda M, Shimura M, Kunikata H, Kanazawa H, Yasuda K, Tanaka Y, et al. Relationship of skin autofluorescence to severity of retinopathy in type 2 diabetes. *Curr. Eye Res.* 2015;40:338-345
95. Yoshioka K. Skin autofluorescence is a noninvasive surrogate marker for diabetic microvascular complications and carotid intima-media thickness in Japanese patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. *Diabetes Ther.* 2018;9:75-85.
96. Yozgatli K, Lefrandt JD, Noordzij MJ, Oomen PHN, Brouwer T, Jager J, et al. Accumulation of advanced glycation end products is associated with macrovascular events and glycaemic control with microvascular complications in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2018 Apr 23.
97. Yue X, Hu H, Koetsier M, Graaff R, Han C. Reference values for the Chinese population of skin autofluorescence as a marker of advanced glycation end products accumulated in tissue. *Diabet Med.* 2011;28(7):818-23.

Адрес за кореспонденция:

д-р Елица Георгиева Хаджиева
Втора катедра по вътрешни болести
ул. „Марин Дринов“ 55
Варна, 9002
e-mail: elihadjieva@yahoo.co.uk