



**UNIVERSITEIT GENT**

**FACULTEIT FARMACEUTISCHE WETENSCHAPPEN**

Vakgroep Klinische Biologie

Laboratorium voor Klinische Chemie

Academiejaar 2012-2013

**FRUCTOSAMINE IN NAGELS:  
ALTERNATIEF VOOR CONTROLE VAN DIABETES IN  
ONTWIKKELINGSLANDEN**

**Sabrina LAGNIAU**

Eerste master geneesmiddelenontwikkeling

Promotor

Prof. Dr. J. Delanghe

Comissarissen

Prof. Dr. W. Lambert

Prof. Dr. C. Stove





**UNIVERSITEIT GENT**

**FACULTEIT FARMACEUTISCHE WETENSCHAPPEN**

Vakgroep Klinische Biologie

Laboratorium voor Klinische Chemie

Academiejaar 2012-2013

**FRUCTOSAMINE IN NAGELS:  
ALTERNATIEF VOOR CONTROLE VAN DIABETES IN  
ONTWIKKELINGSLANDEN**

**Sabrina LAGNIAU**

Eerste master in de Geneesmiddelenontwikkeling

Promotor

Prof. Dr. J. Delanghe

Comissarissen

Prof. Dr. W. Lambert

Prof. Dr. C. Stove

## SAMENVATTING

Het doel van deze masterproef omvatte een verdere uitwerking van de fructosamine assay uitgevoerd op vingernagels. Hierbij was het belangrijk om een differentiatie te maken tussen gezonde personen en patiënten met diabetes. Er is gebleken dat het fructosaminegehalte bij diabetici gemiddeld hoger ligt dan bij gezonde mensen. Dit opent perspectieven om dergelijke analyse naar de toekomst toe meer op de voorgrond te brengen in de zoektocht naar eenvoudige, patiëntvriendelijke en goedkope alternatieven voor de diagnostisering en controle van diabetes. Het is namelijk zo dat dit ziektebeeld meer en meer zijn opmars maakt in derdewereldlanden, terwijl de gezondheidszorg in deze regio's op vlak van diabetes sterk te wensen overlaat. Hierdoor wordt vaak niet tijdig ingegrepen en uiten zich al snel tal van diabetische complicaties, wat de levenskwaliteit van de patiënt aantast. Dit gezondheidsprobleem legt daarnaast ook een zware economische last op gezinnen in ontwikkelingslanden.

Naast het gegeven dat bepaling van fructosamine in vingernagels potentieel nut heeft om diabetes op te sporen, heeft deze thesis ook in beeld gebracht welke eiwitten in de nagel geglyceerd zijn en wat dus precies wordt gemeten bij toepassing van de fructosamine assay.

Theoretisch zou diabetes als het ware kunnen genezen worden indien de wetenschap in staat zou zijn om de glycatieprocessen om te keren. Er is reeds aangetoond dat het menselijk lichaam een enzym bevat, genaamd het fructosamine 3-kinase, dat geglyceerde eiwitten kan herstellen in hun oorspronkelijke vorm. In deze thesis werd getracht om de glycatie in de bestudeerde vingernagels ongedaan te maken, wat positieve resultaten leverde. Incubatie met enzymbevattend serum en de nodige cofactoren resulteerde in een significante afname van het fructosaminegehalte. Dit creëert nieuwe mogelijkheden in de behandeling van diabetes.

Hoewel deze masterproef enkele nieuwe deuren heeft geopend, is verder onderzoek sterk aanbevolen om enerzijds de bepaling van fructosamine in vingernagels verder op punt te zetten, maar anderzijds valt er een nieuwe wereld te ontdekken op vlak van deglycatie waarbij in de toekomst diabetes misschien niet langer als 'ongeneeslijke' ziekte zal bestempeld worden.

## **Dankwoord**

*Om deze thesis tot een goed einde te brengen heb ik kunnen rekenen op de steun van  
verscheidene mensen, die ik wens te bedanken.*

*In eerste instantie wil ik mijn promotor, Prof. Dr. Joris Delanghe, bedanken voor de fijne  
begeleiding gedurende het ganse verloop van deze masterproef. Dankzij U heb ik kunnen  
kennismaken met de fascinerende wereld van de klinische scheikunde. U heeft me een enorm  
boeiend onderwerp aangereikt dat me de kans gaf om me te verdiepen in een topic dat  
mogelijks een grote waarde heeft voor de gezondheidszorg in ontwikkelingslanden. Als jonge  
idealist gaf het mij een bevredigend gevoel om van dergelijk onderzoek deel uit te maken.*

*Ook dien ik Prof. Dr. Apr. Christophe Stove en Prof. Dr. Apr. Willy Lambert te bedanken voor  
de goede begeleiding bij het schrijven van de thesis en het geven van de nodige feedback.*

*Daarnaast gaat mijn dank ook uit naar de hoofdassistente, Elke, omdat zij haar plekje op het  
labo met me deelde. Zij stond altijd klaar om vragen te beantwoorden en heeft me met een  
aanstekelijk enthousiasme bijgestaan in het zetten van mijn eerste stapjes bij het uitvoeren  
van elektroforese. Ik wil ook de andere medewerkers van het labo klinische scheikunde  
bedanken voor de aangename sfeer en de oprechte behulpzaamheid.*

*Deze thesis is mede ook te danken aan de inzet van Prof. Dr. Elisabeth Van Aken, die haar  
patiënten telkens weer motiveerde om hun nagels te laten knippen. Naast deze  
diabetespatiënten wens ik ook de gezonde vrijwilligers te bedanken, die enthousiast hun  
nagels voor me knipten.*

*Een speciaal bedankje wil ik schenken aan Kathy, omdat zij altijd voor me klaarstond en mij  
in mezelf liet geloven.*

*Mijn allergrootste steun en toeverlaat zijn uiteraard mijn ouders, die mij de kans hebben  
gegeven om universitaire studies aan te vatten, hoewel zij zelf deze mogelijkheid niet  
gekregen hebben. Zij hebben me gevormd tot de persoon die ik nu ben en bij deze wil ik hen  
hiervoor bedanken.*

1. INLEIDING .....	1
1.1. DIABETES .....	1
1.1.1. Pathologie.....	1
1.1.2. Evolutie ziektebeeld.....	2
1.1.3. Diagnose en controle .....	3
1.2. NIET-ENZYMATISCHE GLYCATIE.....	4
1.2.1. Reactiemechanisme.....	4
1.2.2. Hba1c.....	5
1.2.3. Fructosamine .....	6
1.3. DEGLYCATIE: HET FRUCTOSAMINE 3-KINASE ENZYM.....	7
1.4. NAGELS: ALTERNATIEF VOOR SERUM OF PLASMA.....	7
1.5. DOEL EXPERIMENT.....	9
1.6. GEBRUIKTE TECHNIKEN .....	12
1.6.1. Fructosamine assay.....	12
1.6.2. Elektroforese .....	12
1.6.3. Boronaat affiniteitschromatografie .....	14
1.6.4. Pyrogallol red-molybdate methode .....	14
2. OBJECTIEVEN .....	16
3. MATERIALEN EN METHODEN .....	17
3.1. BEPALING VAN FRUCTOSAMINE.....	17
3.1.1. Materialen .....	17
3.1.2. Methode .....	17
3.2. EXTRACTIE VAN EIWITTEN.....	18
3.2.1. Materialen .....	18
3.2.2. Methode .....	19
3.3. ELEKTROFORESE: SDS-PAGE .....	20
3.3.1. Materialen .....	20
3.3.2. Methode .....	21
3.4. BORONAAT AFFINITEITSCHROMATOGRAFIE.....	24
3.4.1. Materialen .....	24
3.4.2. Methode .....	25
3.5. DEGLYCATIE .....	26
3.5.1. Materialen .....	26
3.5.2. Methode .....	26

4. <b>RESULTATEN</b> .....	28
4.1. FRUCTOSAMINEGEHALTE.....	28
4.1.1. <b>Diabetes versus niet-diabetes</b> .....	28
4.1.2. <b>Dosis</b> .....	30
4.1.3. <b>Grootte nagelfragment</b> .....	30
4.1.4. <b>Invloed zeep</b> .....	31
4.1.5. <b>Verband tussen glycemische parameters</b> .....	32
4.2. EIWITEXTRACTIE .....	32
4.3. DEGLYCATIE .....	38
5. <b>DISCUSSIE</b> .....	43
6. <b>BESLUIT</b> .....	47
7. <b>LITERATUURLIJST</b> .....	48

# 1. INLEIDING

## 1.1. DIABETES

### 1.1.1. Pathologie

Diabetes is een chronische aandoening die tal van complicaties met zich meebrengt. Deze houden onder andere een verhoogd risico in op cardiovasculaire ziekten, blindheid, amputatie en nierinsufficiëntie. Algemeen worden de effecten van langdurige hyperglycemie onderverdeeld in micro- en macrovasculaire complicaties. Zowel nefropathie, neuropathie als retinopathie worden tot de microvasculaire aandoeningen gerekend, terwijl cardiovasculaire aandoeningen zoals beroertes, coronaire en perifere hartziekten tot de macrovasculaire complicaties behoren (*Fowler, 2008*).

In het lichaam grijpen diverse actieve processen plaats, die input van energie vereisen. Deze wordt geleverd via inname van voedingsstoffen, waaruit de nodige energie wordt vrijgesteld door katabolisme. De belangrijkste energieleveranciers zijn koolhydraten of suikers. Het voornaamste monosaccharide hierbij is glucose, dat via het bloed naar de verschillende organen en weefsels wordt getransporteerd. Om opname van dit suiker in de meeste cellen mogelijk te maken is insuline nodig. Uitzondering hierop vormen de hersenen, lever en rode bloedcellen. Insuline is een hormoon dat wordt aangemaakt door de bètacellen van de pancreas en speelt een belangrijke rol bij het in stand houden van de glucosespiegel in het bloed.

In geval van diabetes zal de glycemie langdurig verhoogd zijn, doordat het glucose niet efficiënt kan opgenomen worden door de cel. Dit kan twee oorzaken hebben. Enerzijds is het mogelijk dat de pancreas onvoldoende insuline produceert doordat een auto-immunreactie plaatsgrijpt tegen de bètacellen. Deze worden hierdoor vernietigd, waardoor de insuline-producerende capaciteit van de pancreas afneemt. In dit geval spreekt men van type I diabetes. Deze vorm wordt ook aangeduid als insuline-afhankelijke diabetes en treedt meestal op bij kinderen en jonge volwassenen (*International Diabetes Federation, 2013*). Om het glucoseniveau in het bloed onder controle te houden moeten patiënten met type I diabetes dagelijks insuline toegediend krijgen via subcutane injectie. Orale inname heeft geen zin, vermits het eiwit wordt afgebroken in het gastro-intestinaal kanaal alvorens het de bloedbaan kan bereiken.



Een tweede vorm van diabetes wordt aangeduid als type II diabetes. Hierbij is er wel nog voldoende insulineproductie, maar de lichaamscellen zijn niet gevoelig voor de effecten van het hormoon. Ongeveer 90% van de diabetici lijdt aan deze vorm van suikerziekte (*World health organisation, 2013*). Hoewel dit type vroeger werd aangeduid als ouderdomsdiabetes, is er een evolutie aan de gang waarbij alsmear meer jongeren worden gediagnosticeerd met type II diabetes. Een stijgende prevalentie van overgewicht op jonge leeftijd in combinatie met onvoldoende lichaamsbeweging ligt hierbij aan de oorzaak (*Kaufman, 2002*). Daar waar insulinetherapie bij diabetes type I onontbeerlijk is, kan bij diabetes type II niet-medicamenteuze behandeling reeds verbetering brengen. Aanpassing van de levensstijl speelt hierin een belangrijke factor.

### **1.1.2. Evolutie ziektebeeld**

Vroeger werd diabetes beschouwd als een ziekte van de Westerse wereld, maar de voorbije decennia heeft de ziekte zich uitgebreid naar vrijwel alle landen van de wereld. De internationale diabetes federatie voorspelt dat het aantal diabetici op globaal niveau met maar liefst 54% zal toenemen, gaande van 284.6 miljoen in 2010 naar 438.4 miljoen tegen 2030 (*Mbanya et al., 2010*). Zorgwekkend hierbij is dat de ziekte vooral zijn opmars zal maken in ontwikkelingslanden. Zo zal het aantal patiënten met diabetes in Sub-Saharisch Afrika uitbreiden met 98%. Daar waar er in 2010 ongeveer 12.1 miljoen gevallen waren in dit gebied, wordt geschat dat dit tegen 2030 zal oplopen tot 23.9 miljoen diabetespatiënten (*Mbanya et al., 2010*). Ook in Azië neemt het aantal diabetici aanzienlijk toe. In dit werelddeel woont maar liefst 60% van de diabetespopulatie. Er zijn verscheidene oorzaken die de stijgende prevalentie van diabetes in ontwikkelingslanden verklaren, met name verstedelijking, verandering in levensstijl en eetgewoontes, verhoogde prevalentie van obesitas en verminderde aanzet tot fysieke activiteit. Daar waar in welgestelde landen de meeste mensen met diabetes boven de pensioensleeftijd zijn, worden in ontwikkelingslanden vooral mensen tussen 35 en 64 jaar getroffen (*World health organisation, 2013*). Deze evolutie is zorgwekkend, vermits de gezondheidszorg in de betreffende landen sterk te wensen overlaat en bijgevolg diabetes vaak niet wordt gedetecteerd of indien de diagnose toch wordt gesteld, niet de nodige medicatie ter

beschikking is. Hierdoor is er een hoog risico op ontwikkeling van diabetische complicaties, die de levenskwaliteit van de patiënt ernstig aantast.

### **1.1.3. Diagnose en controle**

Er zijn drie manieren waarop de diagnose kan vastgesteld worden en controle van de glycemie kan uitgevoerd worden. In eerste instantie kan de nuchtere bloedglucosespiegel bepaald worden. Bij een gezond persoon bedraagt deze doorgaans minder dan 110 mg/dL. In deze test wordt het glucosegehalte gemeten nadat de patiënt minstens 8 uren heeft gevast. Wanneer in deze omstandigheden de glycemie tussen 100 en 125 mg/dL ligt, wijst dit op een gedaalde glucosetolerantie en kan men spreken van prediabetes. Indien deze waarde 126 mg/dL bedraagt of hoger is, en bovendien deze resultaten zich herhalen op een ander tijdstip, dan kan geconcludeerd worden dat de persoon in kwestie diabetes heeft (*National Diabetes Information Clearinghouse, 2013*).

Een andere methode om diabetes vast te stellen is de orale glucose tolerantietest. Deze test is gevoeliger in vergelijking met de vorige, maar de kostprijs ligt wel hoger. Opnieuw moet de patiënt gedurende minstens 8 uren vasten, waarna een suikerhoudende oplossing wordt gedronken. Als de glucosespiegel 2 uren na inname van deze vloeistof tussen 140 en 199 mg/dL ligt, dan is er sprake van prediabetes. Vanaf 200 mg/dL wordt diabetes vastgesteld. Deze waarde moet wel bevestigd worden door een tweede test om zekerheid te hebben over de relevantie van het resultaat (*National Diabetes Information Clearinghouse, 2013*).

Een laatste test is de bepaling van het geglyceerd hemoglobine, dat wordt aangeduid als HbA1c. Dit geeft een indicatie over de gemiddelde bloedconcentratie aan glucose in de voorbije 8 à 12 weken, wat de levensduur is van rode bloedcellen. In essentie zijn er drie redenen waarom dergelijke test efficiënt is; in eerste instantie is hemoglobine het enige eiwit dat gekleurd is, wat fotometrische detectie toelaat. Daarnaast hebben rode bloedcellen een zeer constante levensduur, waardoor de test een goede reproduceerbaarheid heeft en is hemoglobine in relatief hoge concentratie aanwezig. De HbA1c test wordt vooral toegepast ter detectie van type II diabetes en prediabetes, maar is niet aangewezen om type I diabetes, zwangerschapsdiabetes en diabetes bij kinderen vast te stellen. Bij deze bepaling is het niet nodig dat de patiënt vast en vermits het HbA1c gehalte

geen plotse fluctuaties vertoont, kan de uitvoering ervan op elk moment van de dag gebeuren. Bij gezonde individuen ligt het HbA1c-gehalte onder de 5.7 procent. Vanaf 6 procent is er een hoog risico op ontwikkeling van diabetes en als het HbA1c-niveau 6.5 procent bedraagt of hoger is, spreekt men effectief van diabetes (*National Diabetes Information Clearinghouse, 2013*).

De resultaten die men bij elk van deze testen verkrijgt, kunnen variatie vertonen, wat als volgt kan verklaard worden; enerzijds zal de glucosespiegel bij ieder persoon fluctueren van tijd tot tijd. Deze parameter wordt immers beïnvloed door tal van factoren zoals al dan niet inname van voedsel, lichaamsbeweging, ziekte en stress. Ook moet in rekening gebracht worden dat elk van de bestaande testen de glycemie op een andere manier meet. Daarnaast is er binnen eenzelfde test ook variatie mogelijk door lichte wijzigingen in temperatuur, materiaal en staalbehandeling (*National Diabetes Information Clearinghouse, 2013*).

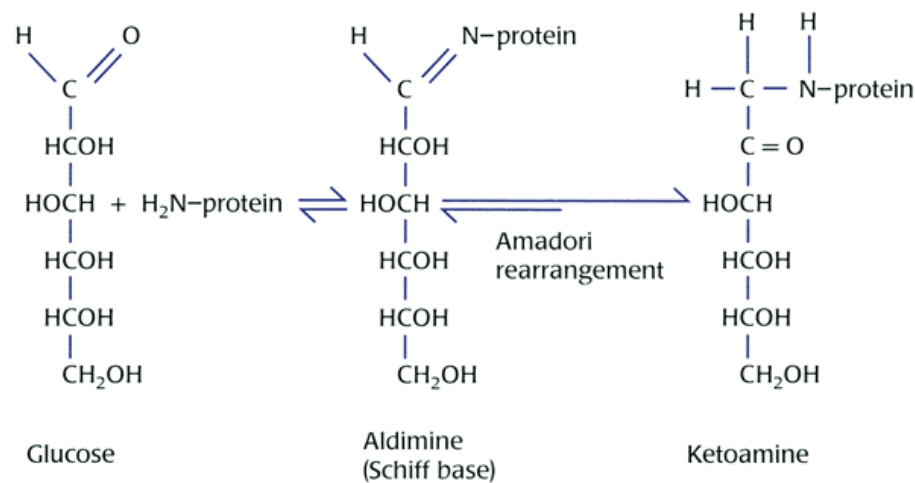
## 1.2. NIET-ENZYMATISCHE GLYCATIE

### 1.2.1. Reactiemechanisme

Een belangrijk gevolg van langdurige hyperglycemie bij diabetes is de chemische interactie tussen het glucose en eiwitmoleculen, waarbij het suiker op niet-enzymatische wijze aan de eiwitten wordt vastgehecht. Dit proces wordt aangeduid als glycatie, waarbij initieel reversibele amadori-producten worden gevormd. Door verdere opeenvolging van reacties worden deze finaal irreversibel omgevormd tot zogenaamde 'advanced glycation end products' (*Peppas et al., 2003*). Dit reactiemechanisme is algemeen gekend als de Maillard reactie. Deze omvat niet louter een alleenstaande reactie, maar overkoepelt een reeks van verschillende reacties waarin eiwitten en reducerende suikers met elkaar interageren. Dit mechanisme wordt aangeduid als niet-enzymatische bruinwording en wordt vooral in de voedingsindustrie uitgebreid bestudeerd. Het is immers zo dat de resulterende Maillard producten verantwoordelijk zijn voor het aroma, de kleur en smaak van voedingsmiddelen. De Maillard reactie werd genoemd naar de Franse chemicus Louis Maillard die deze reactiesequentie voor het eerst beschreef.

De Maillard reactie start bij de condensatie van de vrije aldehydegroep van een suiker/carbohydraat met de  $\epsilon$ -aminogroep van lysine of hydroxylysine enerzijds, ofwel de  $\alpha$ -aminogroep van het N-terminale aminozuur van het eiwit. Suikers kunnen enkel in de open

vorm reageren met proteïnen. Hierbij treedt een nucleofiele aanval op van de carbonylgroep van een acyclisch monosaccharide op de aminogroep van een eiwitmolecule ter vorming van een labiel aldimine (schiff base). Dit product kan opnieuw hydrolyseren tot glucose en het initiële eiwit, maar het is ook mogelijk dat Amadori herschikking plaatsgrijpt. Hierbij wordt een 1-amino-1-deoxyfructose derivaat (N-gesubstitueerd glucosylamine) gevormd via een keto-amine binding. Dergelijke verbinding wordt ook aangeduid als een ketoamine. Dit mechanisme wordt weergegeven in Figuur 1.1. Het resulterende product kan finaal cycliseren tot een ringstructuur (Armbruster, 1987).



**Figuur 1.1: reactiemechanisme van niet-enzymatische glycatie (Bron: Little et al., 2011)**

### 1.2.2. HbA1c

Om diabetes onder controle te houden, is het belangrijk dat de bloedglucosespiegel regelmatig wordt geëvalueerd. Tot op heden gebeurt dit door regelmatige controle van het HbA1c-gehalte.

HbA1c is gemodificeerd hemoglobine, waarbij glucose-eenheden vastzitten op het N-terminale Valine van de  $\beta$ -keten (Association for clinical chemistry, 2012). Deze post-translationale modificatie gaat gepaard met conformationele verandering van de hemoglobine molecule. Het hemoglobine is opgebouwd uit vier ketens, die samen een tetrameer vormen. De meest voorkomende vorm is het HbA0 en maakt 97% van het normale hemoglobine uit. Het is samengesteld uit twee  $\alpha$ -ketens en twee  $\beta$ -ketens. HbA1 stelt algemeen hemoglobine voor waaraan een andere molecule gebonden is. HbA0 en

HbA1c hebben dus dezelfde aminozuursequentie, maar in geval van HbA1c is er een bijkomende negatieve lading aanwezig. Dit maakt scheiding tussen HbA0 en HbA1c mogelijk op basis van moleculaire lading. De methode die hiervoor wordt aangewend, is HPLC (high performance liquid chromatography) met een kation uitwisselingskolom.

Bij chromatografische technieken wordt een mobiele fase langs een stationaire fase geleid, waarbij de staalcomponenten zich verdelen tussen beide fasen. Op basis van hun onderling verschil in affiniteit voor deze fasen zullen ze elk op een ander ogenblik elueren, waardoor ze van elkaar gescheiden worden.

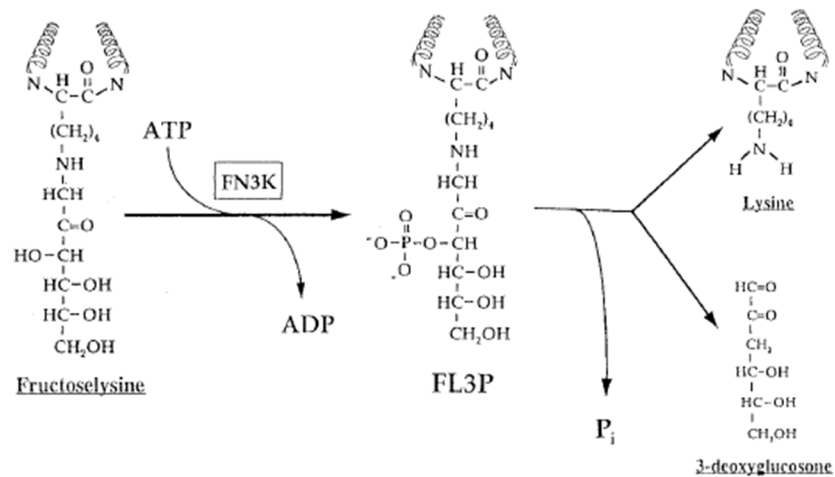
In het geval van kation uitwisselingschromatografie worden positief geladen moleculen uit het geïntroduceerde staal via ionische interacties aangetrokken door de negatieve ladingen van een vaste drager, die als stationaire fase fungeert. Na adsorptie van de staalcomponenten aan de stationaire fase, wordt een buffergradiënt met toenemende ionische sterkte doorheen de kolom gepompt. Aangezien HbA1c minder positief geladen is bij neutrale pH in vergelijking met HbA0, zal het HbA1c minder sterk binden op de negatieve ladingen van de vaste drager en bijgevolg sneller verdrongen worden door de ionen in de mobiele fase. Dit betekent dat deze component als eerste zal elueren.

### **1.2.3. Fructosamine**

Zoals reeds vermeld worden via niet-enzymatische glycatie zogenaamde ketoamines gevormd. Deze producten worden ook wel aangeduid als fructosamines. Doorgaans zijn deze verbindingen het resultaat van interactie tussen glucose en serumproteïnen. Bij diabetes mellitus zal de hoeveelheid fructosamine in het bloed verhoogd zijn in vergelijking met het gehalte bij gezonde personen. Bepaling van deze parameter in serum kan bijgevolg ook nuttig zijn in de controle van diabetes (*Johnson et al., 1982*). Het reflecteert immers de gemiddelde suikerspiegel van de voorbije 2 à 3 weken wanneer deze parameter in het bloed wordt bepaald. Dit betekent dat de fructosamine concentratie sneller zal veranderen dan het HbA1c-gehalte als reactie op wijzigingen in de therapie. Er moet hier wel benadrukt worden dat fructosamines niet tot de glycoproteïnen behoren. Deze laatste worden immers gevormd door enzymatische incorporatie van een suikereenheid tijdens de synthese van de eiwitmoleculen (*Armbruster, 1987*).

### 1.3. DEGLYCATIE: HET FRUCTOSAMINE 3-KINASE ENZYM

Vaak wordt niet-enzymatische glycatie voorgesteld als een irreversibel proces, maar dit idee is reeds achterhaald. Onderzoek heeft immers aangetoond dat er een enzym bestaat dat in staat is om de glycatie ongedaan te maken. Het gaat hier om het fructosamine 3-kinase (FN3K). Dit enzym voert een fosforylatiereactie uit, waarbij fructoselysine residuen als substraat optreden. Deze vormen de belangrijkste ketoamines in het lichaam, dewelke ontstaan door condensatie van glucose met lysine (Armbruster, 1987). Uit Figuur 1.2 blijkt dat de ingevoerde fosfaatgroep dicht bij de carbonylgroep staat, waardoor het gevormde fructoselysine-3-fosfaat (FL3P) niet stabiel is en bijgevolg degradeert tot het initiële lysine, anorganisch fosfaat en 3-deoxyglucosone als bijproduct. Op die manier worden de geglyceerde eiwitten hersteld in hun oorspronkelijke vorm (Szwergold et al., 2001).

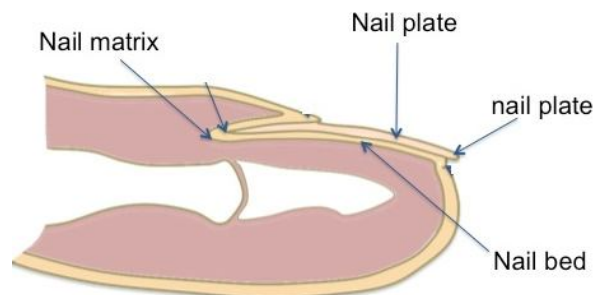


**Figuur 1.2: het reactiemechanisme voor de glycatie onder invloed van het FN3K-enzym (Bron: Szwergold et al., 2001)**

### 1.4. NAGELS: ALTERNATIEF VOOR SERUM OF PLASMA

Nagels kunnen gedefinieerd worden als verhoorde aanhangsels van de huid en bestaan voor ongeveer 80% uit proteïnen. Het gaat hier in hoofdzaak om keratine, wat een verzamelnaam is voor een heterogene groep van fibreuze eiwitten. Er wordt onderscheid gemaakt tussen zogenaamde 'harde' keratine en 'zachte' keratine. Deze onderverdeling is gebaseerd op het verschil in aantal cysteïne-residuen en dus ook het zwavelgehalte. Logischerwijze zijn de harde keratinen rijk aan cysteïne, waardoor een groter aantal crosslinks kan gevormd worden in vergelijking met de zachte keratinen (Moll et al., 2008).

Vingernagels groeien met een constante snelheid van gemiddeld 3 millimeter per maand. Er kunnen verschillende onderdelen onderscheiden worden, waarbij de belangrijkste de nagelplaat, nagelmatrix en nagelbed zijn (zie Figuur 1.3). De nagelplaat kan beschouwd worden als de gekeratiniseerde structuur die roze gekleurd is door onderliggende bloedvaten en waarvan het vrije uiteinde wit is. De nagelmatrix is een epitheliale structuur die zich onder de nagel bevindt en van waaruit de nagelplaat zich vormt. Als laatste wordt het nagelbed beschouwd als de gevasculariseerde huidlaag waarop de nagelplaat rust (*De Berker et al., 2012*).



**Figuur 1.3: anatomie van de nagel**  
(bron: <http://fungusfacts.com/fingernail-fungus/>)

De harde keratine-eiwitten worden beschouwd als deze van het haartype en worden verder onderverdeeld in zure (type I) en basische (type II) keratinestructuren. Deze omvatten 80% van de totale eiwitinhoud der nagels. De zachte keratinestructuren worden aangeduid als epitheliale keratine en zijn van het huidtype. Deze representeren slechts 20% van de nageleiwitten. Wat de nagelplaat betreft, vormen de keratine heterodimeren K5/K14 en K6/K16 10 à 20% van het totale eiwitgehalte (*Bragulla et al., 2009*). De moleculaire gewichten van deze eiwitten bedragen respectievelijk 58 kDa/50 kDa en 56 kDa/48 kDa (*Lynch et al., 1986*). Daarnaast komen in de nagelplaat ook keratine-structuren voor met moleculaire gewichten van 59 kDa (k4), 60 kDa, 46 kDa (k17) en 44 kDa (*Lynch et al., 1986*).

Algemeen kan gesteld worden dat het gebruik van nagels als biologisch materiaal als belangrijk voordeel heeft dat de stabiliteit ervan veel beter is in vergelijking met deze van plasma of serum. Daarnaast geldt ook dat het fructosamine gehalte in de nagel een indicatie geeft over de glycemie gedurende een langere periode, vermits de groei van de nagelplaat vanaf de matrix tot het vrije uiteinde ongeveer 6 à 9 maanden duurt (*Cashman et al., 2010*). In deze periode wordt de nagel continu blootgesteld aan het glucose in het onderliggende nagelbed, dat sterk gevasculariseerd is. Hierdoor worden de nageleiwitten geglyceerd.

## 1.5. DOEL EXPERIMENT

Tot op heden vormen bloedtesten de basis bij diagnostisering en controle van diabetes. Het is echter zo dat elk van de reeds besproken analyses in aanzienlijke mate onderhevig is aan zowel biologische, pre-analytische als analytische variabiliteit. De belangrijkste beperkingen van de beschikbare testen worden weergegeven in Tabel 1.1.

**Tabel 1.1: beperkingen van de beschikbare testen bij diabetes**

Test	Beperkingen
FPG	<ul style="list-style-type: none"><li>- staal niet stabiel</li><li>- grote biologische variabiliteit</li><li>- geen goede correlatie met diabetische complicaties</li><li>- momentopname</li></ul>
OGTT	<ul style="list-style-type: none"><li>- staal niet stabiel</li><li>- lage reproduceerbaarheid</li><li>- omslachtige voorbereiding</li></ul>
HbA1c	<ul style="list-style-type: none"><li>- beïnvloeding door hemoglobinopathiën en gewijzigde levensduur RBC</li><li>- hoge kostprijs</li><li>- in sommige gebieden niet beschikbaar</li></ul>

\*FPG= fasting plasma glucose

\*\*OGTT= orale glucose tolerantie test

Algemeen geldt bij de bepaling van glucose in het bloed dat de inter- en intra-individuele variabiliteit relatief groot is. Dit houdt in dat de glycemie niet enkel grote verschillen vertoont tussen diverse personen, maar daarnaast ook sterk fluctueert binnen eenzelfde individu in functie van de tijd. Ook zijn er verschillende factoren die aanleiding geven tot pre-analytische variabiliteit. Enkele voorbeelden hiervan zijn onder meer acute stress, inname van medicatie, bepaalde ziekte toestanden, eetgewoontes en beweging (Sacks, 2011).

Bloedstalen zijn doorgaans niet stabiel. Wanneer bloed wordt afgenomen blijft de glycolyse doorgaan, waardoor het glucose verder wordt gemetaboliseerd door de rode bloedcellen. Dit betekent dat de glycemie na bloedafname niet constant blijft. Gemiddeld daalt de glucoseconcentratie in een proefbuis zo'n 5 à 7% per uur (Bruns et al., 2009). Stel dat in de ochtend bloed wordt afgenomen in een huisartsenpraktijk en dat de glycemie op dat moment 130 mg/dL bedraagt. Deze waarde wijst op diabetes. Het duurt echter minstens enkele uren vooraleer het staal in het laboratorium terechtkomt en de analyse wordt uitgevoerd. Indien het bloedglucose twee uur later wordt bepaald, zal deze parameter reeds



gedaald zijn tot ongeveer 115 mg/dL, wat onder de grenswaarde ligt om diabetes vast te stellen. Er zal bijgevolg een foute conclusie gesteld worden.

Hoewel vroeger werd gebruik gemaakt van fluoride om de glycolyse te inhiberen, is reeds aangetoond dat dit effect gedurende de eerste 1 à 2 uren niet optreedt. Pas na 4 uren wordt de glycemie gestabiliseerd door toedoen van fluoride. Ondanks het gebruik van deze inhibitor zal de snelheid waarmee het glucose wordt verbruikt in de eerste periode na bloedafname ongewijzigd blijven. De reden voor het vertraagde effect van fluoride is dat het target, met name enolase, pas laat in de glycolytische pathway zijn werking uitoefent (*Bruns et al., 2009*).

Hoewel bepaling van het HbA1c-gehalte tegenwoordig geldt als de ultieme test in het kader van diabetes, zijn er echter situaties waarin het HbA1c-gehalte geen correct beeld geeft over de glycemie. HbA1c-waarden worden immers beïnvloed door talrijke factoren, waardoor de interpretatie ervan niet altijd éénduidig is. Enkele voorbeelden van bijdragende elementen zijn hemoglobinopathieën, acuut of chronisch bloedverlies, hemolytische anemieën, zwangerschap en anemieën van nutritionele aard (*Nitin, 2010*).

Hemoglobinopathieën zijn genetische aandoeningen die kunnen onderverdeeld worden in drie categorieën. De eerste klasse omvat afwijkingen waarbij het resulterende hemoglobine structureel hetzelfde is gebleven, maar in verminderde mate wordt aangemaakt. Deze aandoeningen worden ook wel thalassemieën genoemd. Een volgende groep vertegenwoordigt de hemoglobinopathieën die worden gekenmerkt door aanmaak van structureel afwijkende globine-ketens, die fungeren als de bouwstenen van hemoglobine. In laatste instantie bestaan er ook varianten waarbij de overgang in synthese van  $\gamma$ -ketens naar  $\beta$ -ketens niet plaatsgrijpt. Tijdens de zwangerschap wordt initieel foetaal hemoglobine (HbF) aangemaakt, dat samengesteld is uit twee  $\alpha$ -ketens en twee  $\gamma$ -ketens. Vanaf de negende zwangerschapsweek wordt echter geleidelijk overgeschakeld van  $\gamma$ -productie naar productie van  $\beta$ -ketens, waardoor HbA (adult hemoglobin) kan gevormd worden. Hoewel de synthese van HbF sterk afneemt, blijft deze wel in zekere mate aanwezig. Bij volwassen personen bedraagt deze fractie ongeveer 1% van de totale hoeveelheid hemoglobine.

Uit Figuur 1.4 en 1.5 kan afgeleid worden dat hemoglobinopathieën vooral voorkomen in Sub-Saharisch Afrika, het Indisch subcontinent, Zuid-Oost Azië en het Midden-Oosten. Algemeen kan dus gesteld worden dat deze genetische afwijkingen de hoogste prevalentie hebben in ontwikkelingsgebieden. Het zijn net deze landen die te kampen hebben met een immens groeiende diabetespopulatie zoals reeds werd aangehaald, terwijl de gezondheidszorg hier niet optimaal is. De overheden in de betreffende landen stellen doorgaans weinig middelen ter beschikking ter bestrijding van diabetes, vermits dit niet als prioriteit wordt beschouwd (*Majikela-Dlangamandla et al., 2006*).



**Figuur 1.4: voorkomen van  $\alpha$  en  $\beta$  thalassemie op globaal niveau (Weatherall et al., 2001)**



**Figuur 1.5: voorkomen van de belangrijkste structurele Hb-varianten op globaal niveau (Weatherall et al., 2001)**

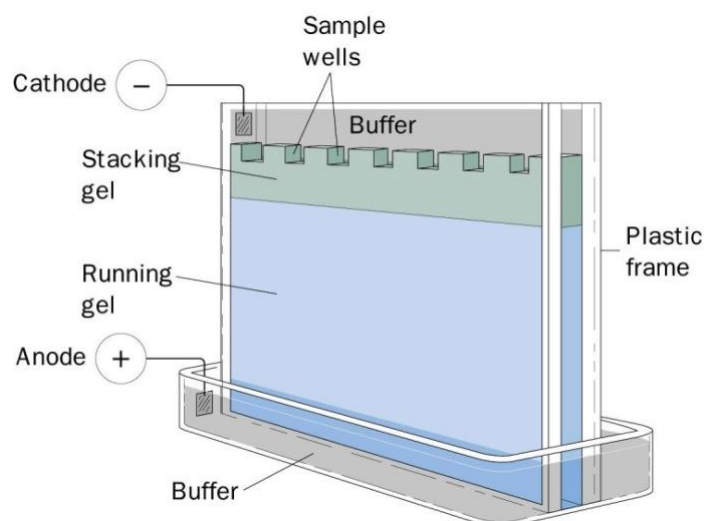
## 1.6. GEBRUIKTE TECHNIEKEN

### 1.6.1. Fructosamine assay

De fructosamine assay omvat het volgende; een bepaald volume serumstaal wordt samengevoegd met 1 mL reagens. Dit reagens bevat 0.25 mMol/L NBT (nitro blue tetrazolium), 0.1 M natrium carbonaat/bicarbonaat buffer (pH 10.3) en 0.1% Triton X-100. In alkalisch milieu is fructosamine in staat om NBT te reduceren tot formazan. De concentratie van het gevormde product kan na incubatie bij 37°C gedurende 60 minuten colorimetrisch gemeten worden bij 530 nm met behulp van een spectrofotometer. Hierbij geldt dat de hoeveelheid fructosamine overeenstemt met de hoeveelheid formazan die ontstaat (Johnson, 1982).

### 1.6.2. Elektroforese

Na extractie van eiwitten uit de vingernagels, wordt elektroforese uitgevoerd om de verschillende eiwitmoleculen te visualiseren. Op die manier wordt bevestigd dat het bekomen extract effectief nageleiwitten bevat. In geval van eiwitten wordt doorgaans gebruik gemaakt van SDS-PAGE. Dit houdt in dat een polyacrylamidegel wordt gebruikt om de eiwitten te scheiden louter op basis van hun moleculair gewicht. Een weergave van de opstelling wordt afgebeeld in Figuur 1.6.



**Figuur 1.6: weergave van de opstelling voor de elektroforetische run.**

**(Bron: <http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter6/F06-21.jpg>)**

In principe zijn eiwitten amfotere moleculen, wat inhoudt dat zij zowel positieve als negatieve ladingen kunnen dragen. In geval van elektroforese wordt een elektrische stroom

aangelegd doorheen de gel, wat de eiwitten aanzet om naar de elektrode met tegenovergestelde lading te migreren. Zo zullen positief geladen moleculen in de richting van de kathode (negatieve elektrode) bewegen, terwijl de negatief geladen moleculen zich naar de anode toe verplaatsen. Het SDS (sodium dodecyl-sulfate) zorgt ervoor dat alle eiwitmoleculen een netto negatieve lading krijgen en bijgevolg allen in dezelfde richting doorheen de gel zullen migreren. Het negatief geladen SDS gaat immers de eigen netto lading van de eiwitmolecule maskeren via niet-covalente binding met het eiwit. Dit zorgt ervoor dat de configuratie van het eiwit wijzigt en bijgevolg denaturatie optreedt. Algemeen geldt dat de kleinere fragmenten sneller doorheen de polyacrylamidegel bewegen in vergelijking met de grotere moleculen. Deze migratie is mogelijk doordat bufferionen ervoor zorgen dat de elektrische stroom doorheen de gelmatrix wordt geleid (*Thermo Scientific, 2013*).

Voor de bereiding van de gel wordt acrylamide gemengd met bisacrylamide. Deze vormen samen een polymeer netwerk van cross-links na toevoeging van ammoniumpersulfaat (APS), dat als polymeriserend reagens optreedt. Daarnaast wordt de polymerisatiereactie gekatalyseerd door gebruik te maken van TEMED (N, N, N, N-tetramethyleendiamine). De poriënafmeting van de resulterende gel is afhankelijk van de hoeveelheid acrylamide die wordt gebruikt. Hoe hoger het percentage acrylamide is, hoe kleiner de poriën zullen zijn (*Thermo Scientific, 2013*).

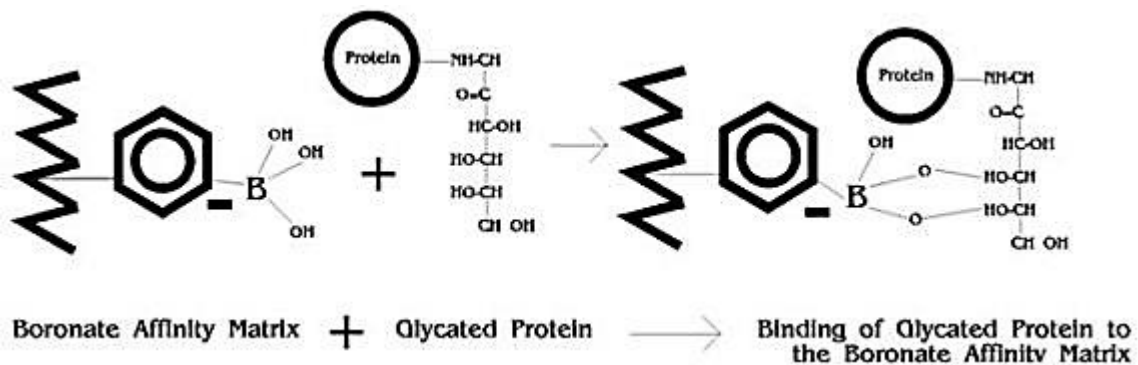
Om een goede resolutie te verkrijgen wordt bovenop de zogenaamde scheidende ("resolving") gel een "stacking" gel geplaatst. Deze laatste bevat een lagere concentratie aan acrylamide en heeft een lagere pH. De stacking gel zorgt ervoor dat het staal initieel in een nauwe band wordt samengeperst alvorens het de scheidende ("resolving") gel bereikt. Er is hier dus sprake van een discontinu buffersysteem, vermits de zuurtegraad in beide gels verschillend is (*Thermo Scientific, 2013*).

Na afloop van de elektroforese bekomt men een bandenpatroon waaruit bepaalde informatie kan gehaald worden. De intensiteit en de breedte van de eiwitbanden geven een indicatie over de relatieve hoeveelheid van de eiwitten, terwijl de positie van deze banden de relatieve grootte van de moleculen aangeeft.

### 1.6.3. Boronaat affiniteitschromatografie

Om de geglyceerde eiwitten in het nagelextract te scheiden van de niet-geglyceerde eiwitten wordt doorgaans de boronaat affiniteitsmethode toegepast. Deze chromatografische techniek berust op het feit dat boronaat in staat is om esterificatie te ondergaan door reactie met moleculen die een 1,2-cis-diol groep bevatten. Dit wordt geïllustreerd in Figuur 1.7. Dergelijke functionele groep wordt enkel teruggevonden bij geglyceerde proteïnen, waardoor deze selectief worden weerhouden op een chromatografische kolom, die geïmpregneerd is met een derivaat van boronaat.

De niet-geglyceerde eiwitten zullen onmiddellijk elueren, vermits deze componenten geen interactie met de stationaire fase vertonen. De twee hydroxylfuncties die bij geglyceerde eiwitten aanwezig zijn, maken immers deel uit van het suikergedeelte, dat bij niet-geglyceerde eiwitten ontbreekt. Om in een tweede fase ook de geglyceerde eiwitten te laten elueren wordt gebruik gemaakt van een oplossing met sorbitol. Dit suikeralcohol is in staat om de geglyceerde eiwitten te verdringen van de kolom.



Figuur 1.7: basisprincipe van boronaat affiniteitschromatografie

(Bron: [http://www.trinitybiotech.com/HbA1c\\_HB/Pages/BoronateAffinity.aspx](http://www.trinitybiotech.com/HbA1c_HB/Pages/BoronateAffinity.aspx))

### 1.6.4. Pyrogallol red-molybdate methode

Algemeen zijn reeds verschillende methoden beschreven om het totaal eiwitgehalte in urine te bepalen. Er kan een onderverdeling worden gemaakt in twee groepen: Enerzijds bestaan er turbidimetrische methoden, die echter worden gekenmerkt door een lage precisie en gevoeligheid, alsook een beperkte lineariteit. Daarnaast kan ook gebruik gemaakt worden van methoden die gebaseerd zijn op binding met kleurstoffen. Doorgaans scoren dergelijke methoden beter op vlak van precisie, gevoeligheid en uitvoerbaarheid. Binnen deze groep onderscheidt de 'pyrogallol red-molybdate' (PRM) methode zich van de rest

doordat bij deze assay geen adsorptie van het reagens aan de wand van de cuvet plaatsgrijpt. Een ander voordeel is dat het reagens niet corrosief is (*Orsonneau et al., 1989*).

Het totaal eiwitgehalte in nagelextract wordt bepaald met behulp van een Cobas 8000 modular analyzer. Dit toestel meet de eiwitconcentratie aan de hand van de PRM methode. Hierbij wordt pyrogallol samengevoegd met molybdaat ( $\text{MoO}_4^{4-}$ ) ter vorming van een roodgekleurd complex, dat een absorptiemaximum vertoont bij 480 nm. Wanneer het 'pyrogallol red-molybdate' complex reageert met de basische aminogroepen van eiwitmoleculen, wordt een blauwgekleurd complex gevormd. Deze colorimetrische reactie gaat gepaard met een verschuiving van het absorptiemaximum naar 600 nm. De absorbantie bij deze golflengte is recht evenredig met de eiwitconcentratie in het gemeten staal (*Beckman Coulter, 2009*).

Bij een kleurreactie is het steeds zo dat eiwitten onderling een verschil in affiniteit voor de kleurstof vertonen. Deze die sterk interageren, worden hierdoor overschat, terwijl de eiwitten met lage affiniteit onderschat worden. Om deze variabiliteit in respons te compenseren, werd de methode geoptimaliseerd door *Orsonneau et al.* Er werd aangetoond dat het gebruik van SDS een gunstig effect heeft op de gevoeligheid van eiwitten voor de kleurreactie. Een mogelijke verklaring hiervoor is het feit dat SDS zorgt voor de ontvouwing van polypeptideketens, waardoor er meer basische aminogroepen vrij komen te liggen, dewelke kunnen interageren met de kleurstof in kwestie.

## 2. OBJECTIEVEN

De reeds bestaande testen ter controle van diabetes hebben elk hun beperkingen. Langs de ene kant worden de FPG-test (fasting plasma glucose) en de orale glucose tolerantie test gekenmerkt door respectievelijk een grote biologische variabiliteit en lage reproduceerbaarheid (*Sacks, 2011*). Daarnaast is ook de beperkte stabiliteit van de stalen een struikelblok. Anderzijds vertoont ook het HbA1c enige beperkingen, waaronder de beïnvloeding door hemoglobinopathieën. In combinatie met de stijgende prevalentie van deze ziekte in ontwikkelingslanden zijn dit voldoende redenen om op zoek te gaan naar een patiëntvriendelijk, goedkoop en efficiënt alternatief voor de diagnostisering en controle van diabetes. Het onderwerp van deze thesis tracht binnen deze zoektocht nieuwe mogelijkheden te creëren.

Hoewel momenteel fructosamine wordt gemeten in serum, was het doel van deze masterproef om dezelfde methode toe te passen op vingernagels. De keuze om louter te werken met vingernagels heeft als verklaring dat diabetespatiënten vaak letsels aan de voeten vertonen door de langdurige hyperglycemie, waardoor de doorbloeding van de onderste ledematen vaak niet optimaal is. Er werd hierbij verder gebouwd op het onderzoek dat werd gestart door Antoine Sadiki. Er werd door IFCC Professional Scientific Exchange Program Scholarship een beurs toegekend aan deze Congolese man, zodat hij de kans kreeg om 3 maanden op het laboratorium klinische chemie van het UZ Gent te werken. Vanuit zijn achtergrond als Afrikaan weet hij als geen ander hoe belangrijk het is om op zoek te gaan naar een methode die diagnostisering en controle van diabetes mogelijk maakt op een eenvoudige en goedkope manier, gelet op de voorspelde toename van diabetici in ontwikkelingslanden.

Voor de bepaling van HbA1c, wat momenteel de routine analyse is bij diabetes, is dure apparatuur vereist, die vaak niet beschikbaar is in de Sub-Saharische landen. Ook staat de Afrikaanse bevolking nogal weigerachtig tegenover bloedafname. Als dan toch bloed wordt geprikt, is het vaak twijfelachtig of dit met een steriele naald gebeurt. Daarom zou het toepassen van de fructosamine assay op vingernagels een ideaal alternatief zijn. De vereiste reagentia zijn relatief goedkoop, er is weinig staalvoorbereiding en er is geen angstwekkende bloedprik nodig.

### 3. MATERIALEN EN METHODEN

#### 3.1. BEPALING VAN FRUCTOSAMINE

##### 3.1.1. Materialen

De gebruikte reagentia en apparatuur worden respectievelijk voorgesteld in Tabellen 3.1 en 3.2.

**Tabel 3.1: specificaties van de gebruikte reagentia voor de bepaling van fructosamine**

Product	Specificaties
<b>Nitrotetrazolium blue chloride</b>	Sigma-Aldrich, USA Lot MKBK8574V
<b>Sodium carbonate, anhydrous</b>	UCB, Brussels
<b>Sodium hydrogen carbonate</b>	UCB, Brussels
<b>Triton X-100</b>	Sigma Aldrich, USA Lot SLBB1491V

**Tabel 3.2: specificaties van de gebruikte apparatuur voor de bepaling van fructosamine**

Apparatuur	Specificaties
<b>1800 spectrophotometer</b>	Shimadzu T-1610
<b>Cuvette semi-micro high form</b>	Novolab Lot 3726/09
<b>Weegschaal</b>	Mettler Toledo AE200 T100
<b>Incubatie oven</b>	VEL T916 Type: RB360
<b>Micropipet 1000 µL</b>	Eppendorf reference T0927

##### 3.1.2. Methode

Als biologisch materiaal worden afgeknipte vingernagels van zowel gezonde personen als diabetici verzameld. In eerste instantie wordt telkens een bepaalde hoeveelheid van elk staal afgewogen in de grootteorde van enkele milligram. Dit wordt overgebracht in semi-microcuvetten, waarna 1 mL fructosamine reagens wordt toegevoegd met behulp van een micropipet. Het geheel wordt gedurende 60 minuten geïncubeerd bij 37°C.



Het fructosamine reagens wordt telkens per volume van 200 mL aangemaakt. De benodigde hoeveelheden natriumcarbonaat (MW: 105.99 g/mol) en -bicarbonaat (MW: 84.01 g/mol) worden berekend via de Henderson-Hasselbach formule, rekening houdend met het feit dat de pka 10.3 bedraagt en de zuurtegraad 10.3 moet zijn. De concentratie van de buffer dient 0.1 M te zijn.

$$pH = pka + \log \frac{[Base]}{[Zuur]} \text{ of } pH = pka + \log \frac{n_{Base}}{n_{Zuur}}, \text{ waarbij geldt: } n_{Base} + n_{Zuur} = 0.02 \text{ mol}$$

Op basis van bovenstaande formule wordt telkens 1.06 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 0.84 g NaHCO<sub>3</sub> afgewogen om tot de gewenste concentratie te komen. Wat het nitrotetrazolium blue chloride (MW: 817.7 g/mol) betreft, is een concentratie van 0.25 mM gewenst. Om 200 mL van het reagens aan te maken moet telkens 40.9 mg afgewogen worden. Ook wordt telkens 200 µL Triton X-100 toegevoegd om een finale concentratie van 0.1% te verkrijgen.

Na incubatie wordt de absorbantie van de oplossing gemeten bij 530 nm. Dit gebeurt met behulp van een spectrofotometer. Als blanco wordt gebruik gemaakt van fructosamine reagens, waaraan geen biologisch materiaal is toegevoegd. Op basis van de gemeten absorbantie kan de fructosamine concentratie berekend worden via lineaire regressie. Het resultaat wordt telkens uitgedrukt in µmol fructosamine per gram nagel.

### 3.2. EXTRACTIE VAN EIWITTEN

#### 3.2.1. Materialen

De hulpmiddelen en reagentia die in dit onderdeel worden aangewend, kunnen respectievelijk teruggevonden worden in Tabellen 3.3 en 3.4.

**Tabel 3.3: specificaties van de gebruikte materialen bij eiwitextractie**

Materialen	Specificaties
<b>Folded filters</b>	Schleicher & Schuell
<b>Hotplate Magnetic Stirrer</b>	Cenco Cat# 34532
<b>Weegschaal 400g</b>	Scout Pro T0917
<b>Sterile plastic Pipet 10 mL</b>	LP ITALIANA SPA Lot N7061F AA

**Tabel 3.4: specificaties van de producten die worden gebruikt bij de eiwitextractie**

Producten	Specificaties
Urea	Bio-rad Laboratories
Thiourea	Sigma-Aldrich, USA Lot BCBH9695V Pcode 101217337
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethaan	Vel Lot 00B10042
HCl (zoutzuur) 1M	TMC (Touler Made Chemicals) Lot 10001031351
2-Mercaptoethanol	Fluka AG
Chloroform	Merck K10947045
Methanol	Tailer Made Chemicals Lot 14.002.19.02.10

### 3.2.2. Methode

De extractie wordt uitgevoerd volgens de zogenaamde 'Shindai methode' (*Nakamura et al., 2002*). De benaming van deze procedure is gebaseerd op het feit dat deze extractiemethode werd ontwikkeld op de Shinshu Universiteit. In eerste instantie worden de afgeknipte nagels kortstondig gewassen met ethanol om onzuiverheden weg te spoelen. Vervolgens worden externe lipiden verwijderd door de nagelfragmenten gedurende 24 uren te laten weken in een oplossing die chloroform en methanol bevat (2:1 v/v).

In een volgende fase worden de nagels overgebracht in een oplossing die 25 mM tris (MW: 121.14 g/mol), 2.6 M thiourea (MW: 76.12 g/mol), 5 M urea (MW: 60.06 g/mol) en 5% 2-mercaptoethanol bevat. Het geheel wordt gedurende 3 dagen geïncubeerd.

De trisHCl-buffer wordt hierbij als volgt bereid; eerst wordt het aantal mol Tris berekend dat nodig is om 200 mL oplossing aan te maken. Dit gebeurt op basis van onderstaande formules:

$$n_{Tris} = molariteit \times volume$$

$$massa = MW \times n_{Tris}$$

Het berekende gewicht aan Tris bedraagt 0.6057 g en wordt na afwegen opgelost in ongeveer 1/3 van het totaal volume aan gedestilleerd water. Om de gewenste pH van 8.5 te

verkrijgen wordt druppelgewijs HCl 1 M toegevoegd, terwijl de zuurtegraad wordt opgevolgd met behulp van een pH-elektrode.

Uiteindelijk worden de overige reagentia toegevoegd aan de Tris-buffer. Hiervoor wordt 39.5842 g thiourea en 60.06 g urea afgewogen. Als laatste wordt 20 mL 2-mercaptoethanol bijgevoegd, waarna het geheel wordt aangelengd tot het totaalvolume met gedestilleerd water. Om een homogene oplossing te verkrijgen wordt gebruik gemaakt van een magnetische roerder, vermits een relatief grote hoeveelheid aan vaste stof moet opgelost worden in een beperkt volume.

Uit onderzoek is gebleken dat de conventionele methode voor extractie van eiwitten een lager rendement geeft (*Nakamura et al., 2002*). Er werd aangetoond dat zowel thiourea, urea als 2-mercaptoethanol bijdragen tot een gunstig extractierendement. Elk van deze stoffen draagt immers bij tot de denaturatie van proteïnen. In het geval van 2-mercaptoethanol is dit effect te wijten aan reductie van disulfide-bruggen.

Na driedaagse incubatie blijken de nagels een gelachtige consistentie verworven te hebben. De volgende stap is filtratie van het brouwsel, waarna met het filtraat kan verder gewerkt worden.

### 3.3. ELEKTROFORESE: SDS-PAGE

#### 3.3.1. Materialen

In Tabellen 3.5 en 3.6 worden respectievelijk de gebruikte producten en benodigheden weergegeven die voor uitvoering van de elektroforese nodig zijn.

**Tabel 3.5: voorstelling van de benodigde producten bij elektroforese**

Producten	Specificaties
<b>30% Acrylamide/bis oplossing</b>	Bio-Rad L1610158
<b>TEMED</b>	Bio-Rad L1610860
<b>Precision Plus Protein Dual color standards</b>	elektroforese ladders prestained
<b>Azijnzuur 100% (ijsazijn)</b>	Merck K43073263202
<b>Methanol</b>	Tailer Made Chemicals Lot 14.002.19.02.10
<b>2-Mercaptoethanol</b>	Fluka AG

**Tabel 3.5: voorstelling van de benodigde producten bij elektroforese (vervolg)**

Producten	Specificaties
<b>Trizma Base</b>	Sigma-Aldrich, USA Lot 32H-562015
<b>Sodium dodecyl sulfata</b>	Sigma-Aldrich, USA L3771-100G
<b>Glycine</b>	Sigma-Aldrich, USA Lot BCBB8940
<b>Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250</b>	Bio-Rad L1610400
<b>Ammoniumpersulfata</b>	Bio-Rad Laboratories

**Tabel 3.6: weergave van de gebruikte hulpmiddelen voor de uitvoering van elektroforese**

Apparatuur	Specificaties
<b>Shaker Incubator SI 100</b>	Pharmacia Diagnostics
<b>Mini Trans-Blot Cell</b>	Serial nr: 153BR75473 Bio-Rad
<b>Micropipetten:</b>	1000µL: Eppendorf reference T0927 500µL: Eppendorf T500 200µL: Transferpette CH15 20µL: Transferpette CH16 10µL: Eppendorf reference CH55 CH51
<b>Spacer plates</b>	Bio-Rad PN102203
<b>Short plates</b>	Bio-Rad PLN102314

### 3.3.2. Methode

De eerste stap bij elektroforese is het gieten van een 12% resolving gel. In ons geval wordt een protocol gevolgd dat toelaat om 2 kleine gels te gieten. Hiertoe wordt een oplossing bereid, waarbij in eerst instantie 5.3 mL gedestilleerd water, 6.4 mL van een 30% acrylamide/bisacrylamide oplossing, 200 µL van een 10% APS-oplossing, 160 µL van een 10% SDS-oplossing en 4 mL van een reeds bereide 1.5 M Tris-buffer met pH 8.8 worden samengevoegd. Om 500 mL van dergelijke buffer te maken, zou 90.83 g Tris moeten

afgewogen worden, waarna deze massa opgelost wordt in een volume van ongeveer 400 mL. Daarna wordt de pH op het gewenste niveau gebracht door HCl toe te druppelen, zodat finaal het volume kan aangelengd worden tot 500 mL. De 10% APS-oplossing wordt bereid door 50 mg APS op te lossen in 500  $\mu$ L gedestilleerd water. Om de 10% SDS-oplossing aan te maken, wordt 1 g SDS opgelost in 10 mL gedestilleerd water.

TEMED wordt pas als laatste toegevoegd, omdat vanaf het moment TEMED wordt bijgevoegd, de polymerisatiereactie snel van start gaat. Na toevoeging van TEMED moet de ruimte tussen de glazen platen zo snel mogelijk opgevuld worden met de geloplossing. Dit gebeurt met een pasteurpipet, waarbij er op wordt gelet dat er geen luchtballen in de gel terechtkomen. Er wordt een volume van 8  $\mu$ L TEMED aangewend.

Na het gieten van de resolving gel, moet deze gedurende 30 minuten polymeriseren bij kamertemperatuur. Ondertussen wordt de oplossing voor de 4% stacking gel samengesteld. Deze bevat dezelfde componenten als de resolving gel, maar de hoeveelheden en zuurtegraad zijn anders in vergelijking met de resolving gel. Voor de stacking gel wordt 6.0 mL gedestilleerd water, 1.33 mL van een 30% acrylamide/bisacrylamide oplossing, 2.5 mL van een 0.5 M Tris-buffer met pH 6.8, 100  $\mu$ L van een 10% SDS-oplossing, 100  $\mu$ L van een 10% APS-oplossing en 10  $\mu$ L TEMED samengebracht en gemengd. Hierna wordt de oplossing voor de stacking gel bovenop de reeds gepolymeriseerde resolving gel gebracht met een pasteurpipet, waarna we het geheel nog eens 30 minuten laten polymeriseren bij kamertemperatuur.

De tris-buffer wordt bereid door 6.06 g Tris af te wegen en op te lossen in ongeveer 80 mL gedestilleerd water. Hierna wordt de zuurtegraad aangepast door toevoeging van HCl. Vervolgens wordt het geheel aangelengd tot 100 mL, waardoor een eindconcentratie van 0.5 M wordt bereikt.

Alvorens de gel in zijn geheel kan gebruikt worden, moet deze eerst 3 tot 4 h polymeriseren in de ijskast. In de tussentijd worden voorbereidingen getroffen voor het laden van de stalen op de gel. Elk van de stalen die afkomstig zijn van willekeurige personen, wordt in een 1:1 v/v verhouding gemengd met een laadbuffer die 5% 2-mercaptoethanol bevat. Het gebruik van laadbuffers heeft drie voordelen: Enerzijds wordt de dichtheid van het staal verhoogd, waardoor de eiwitten optimaal in het sleufje zinken bij het laden van de

gel. Daarnaast zorgt de laadbuffer voor het kleuren van de stalen, wat het laden in de slotjes vereenvoudigt. Ten slotte laat de kleurstof door migratie naar de anode in het elektrisch veld toe om op te volgen hoe de elektroforese vordert (*KULeuven, practicum 2001*).

Naast een laadbuffer zijn in het volgende gedeelte van de elektroforese ook een elektroforesebuffer, een CBB R-250 oplossing en een CBB "destaining" oplossing nodig. De elektroforesebuffer bevat 25 mM Tris, 92 mM glycine (MW: 75.07 g/mol) en 0.1% SDS. Deze wordt bereid door 15 g Tris, 72 g glycine en 5 g SDS af te wegen. Deze componenten worden samengebracht en aangelengd tot 450 mL. Vervolgens wordt het geheel op pH 8.3 gebracht door toevoeging van HCl, waarna finaal wordt aangelengd tot het totaalvolume van 500 mL. Deze stockoplossing, die in de ijskast wordt bewaard, wordt nogmaals 1/10 verdund met water net voor gebruik.

De CBB R-250 oplossing is samengesteld uit 0.1% CBB R-250, 0.5% azijnzuur en 20% methanol. Hierbij staat CBB voor Coomassie Brilliant Blue, dat ervoor zorgt dat de eiwitten na elektroforetische scheiding zichtbaar worden gemaakt. Het CBB bindt immers met de eiwitfragmenten, die hierdoor een blauwe kleur krijgen. Voor de bereiding van 250 mL oplossing dient 0.25 g CBB R-250, 1.25 mL azijnzuur en 50 mL methanol bij elkaar gevoegd te worden, maar vooraf moet het CBB R-250 afzonderlijk in water opgelost worden. Daarna kan het geheel aangelengd worden met gedestilleerd water tot het gewenste eindvolume.

Finaal is er ook een CBB ontkleuringsoplossing nodig, die 10% azijnzuur en 20% methanol bevat. Ter bereiding van 500 mL oplossing wordt bijgevolg 50 mL azijnzuur en 100 mL methanol samengevoegd en aangelengd tot het gewenste eindvolume.

Na 3 à 4h in de ijskast te hebben gestaan, kunnen de gels eruit genomen worden. Deze worden in de elektroforesetank geplaatst, waarvan het binnenste alsook het onderste compartiment wordt gevuld met elektroforesebuffer.

Vooraleer de stalen met laadbuffer in de slotjes worden geladen, worden de eppendorpjes met staal gedurende één minuut verwarmd in kokend water. Dit proces zorgt voor denaturatie van de eiwitten. Hierna worden verschillende volumina van de stalen op de gel geladen.

Vervolgens kan de elektroforesetank aangesloten worden op een elektrische stroom. Het eerste kwartier moet de stroom op 150 V staan, gevolgd door een stroomverhoging tot 200 V die 1h wordt aangehouden.

Na afloop worden de cassettes waarin de gels zitten uit de elektroforesetank gehaald, zodat de gels van tussen de glasplaten kunnen worden verwijderd. Deze worden overgebracht in doorzichtige schalen, waarin een kleine hoeveelheid CBB R-250 oplossing wordt gegoten. Op die manier kunnen de eiwitten gekleurd worden ter visualisatie. Het geheel wordt op een schudincubator geplaatst en na ongeveer 30 minuten wordt een eerste maal gecheckt of er reeds voldoende kleuring is. Vervolgens wordt de overmaat kleurstof weggewassen door toevoeging van de CBB ontkleuringsoplossing. Dit proces wordt enkele malen herhaald tot het merendeel van de niet-gebonden kleurstof verwijderd is.

### 3.4. BORONAAFFINITEITSCHROMATOGRAPHIE

#### 3.4.1. Materialen

De gebruikte producten en benodigdheden die worden aangewend bij boronaat affiniteitschromatografie, worden respectievelijk voorgesteld in Tabellen 3.7 en 3.8.

**Tabel 3.7: specificaties van de benodigde producten bij affiniteitschromatografie**

Producten	Specificaties
Ethylenediaminetetra-acetic acid dipotassium salt	BDH Laboratory reagents
Magnesiumchloride hexahydrate (RNase Free)	Sigma Aldrich, USA Lot 122H0201
Sorbitol (D-glucitol)	Sigma Aldrich Lot 77H06901
Sodium Hydroxide 1 M	VWR
Ammonium Acetate	Biosolve (the Netherlands)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethaan	Vel Lot 00B180042
M-aminophenyl-boronic acid-agarose	Sigma-Aldrich

**Tabel 3.8: specificaties van de gebruikte apparatuur bij affiniteitschromatografie**

Apparatuur	Specificaties
Econo-Column	Bio-Rad ID: 0.5 cm/ L: 10 cm/ V: 2 mL

### 3.4.2. Methode

Aanvankelijk worden de nodige oplossingen bereid. Enerzijds wordt een wasbuffer samengesteld, die 0.25 M ammoniumacetaat (MW: 77.08 g/mol) en 0.05 M magnesiumchloride bevat. Er wordt gestart met de aanmaak van een volume van 200 mL. In het geval van magnesiumchloride moet rekening gehouden worden met het feit dat de hexahydraatvorm (MW: 203.3 g/mol) ter beschikking is, waardoor het af te wegen gewicht moet omgerekend worden via onderstaande redenering;

- ⇒  $\frac{0.05 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} \times 200 \text{ mL} = 0.01 \text{ mol MgCl}_2$
- ⇒ 1 mol  $\text{MgCl}_2 \sim 1 \text{ mol MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- ⇒  $0.01 \text{ mol} \times 203.3 \text{ g/mol} = 2.03 \text{ g MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

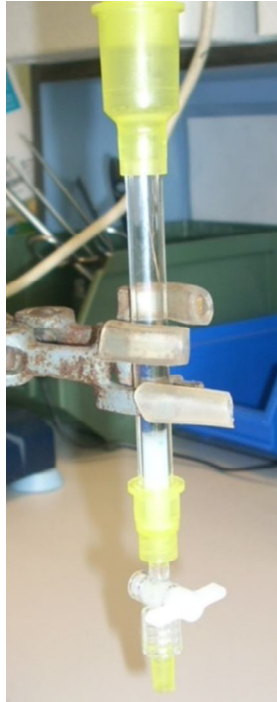
Na afwegen van bovenstaand gewicht aan magnesiumchloride.hexahydraat en 3.85 g ammoniumacetaat, worden deze reagentia opgelost in ongeveer 150 mL gedestilleerd water. Hierna wordt de pH op 8.3 gebracht door natriumhydroxide toe te druppelen, terwijl de zuurtegraad via een pH-elektrode wordt opgevolgd. Finaal wordt de oplossing verder aangelengd met gedestilleerd water tot het eindvolume.

De elutiebuffer omvat 0.1 M Tris, 0.2 M sorbitol (MW: 182.2 g/mol) en 0.05 M EDTA (ethyleendiaminetetra-azijnzuur). Ter aanmaak van 200 mL wordt 2.42 g Tris, 7.29 g sorbitol en 4.04 g ethyleendiaminetetra-azijnzuur dikalium zout dihydraat (MW: 404.47 g/mol) afgewogen. Wat deze laatste component betreft, moet in rekening gebracht worden dat de dikalium zout dihydraatvorm ter beschikking is en bijgevolg met het moleculair gewicht van deze laatste moet rekening gehouden worden in analogie met het magnesiumchloride.

Er wordt gewerkt met een chromatografische kolom, die wordt afgebeeld in Figuur 3.1. De kolom heeft een interne diameter van 0.5 cm en een lengte van 10 cm. Dergelijk type kolom is vooral geschikt voor LPLC (Low Pressure Liquid Chromatography). Als stationaire fase wordt hier gebruik gemaakt van m-aminophenyl boronaat agarose, waarvan 1 mL op de kolom wordt gepipetteerd. Vervolgens wordt een equilibratie uitgevoerd door enkele mL wasbuffer doorheen de kolom te laten lopen. Hierna kan gestart worden met de chromatografische run. Telkens wordt 1 mL van het extract op de kolom gebracht. Vervolgens wordt de kolom gewassen met enkele mL wasbuffer. Het eluens wordt



opgevangen in een plastic buisje en bevat de niet-geglyceerde eiwitten, vermits deze niet worden weerhouden op de kolom. Daarna wordt ongeveer 2 mL elutiebuffer op de kolom gebracht, wat er voor zorgt dat uiteindelijk ook de geglyceerde eiwitten elueren. Het eluens wordt opgevangen in een tweede plastic buis.



**Figuur 3.1: weergave van de gebruikte kolom voor affiniteitschromatografie**

### 3.5. DEGLYCATIE

#### 3.5.1. Materialen

De producten die worden aangewend bij deglycatie, worden opgesomd in Tabel 3.9. De gebruikte materialen worden reeds hiervoor beschreven.

**Tabel 3.9: specificaties van de gebruikte reagentia bij deglycatie**

Producten	Specificaties
<b>ATP (adenosine 5'-trifosfaat dinatrium zout)</b>	Sigma Aldrich, USA Lot 83F-7295
<b>Magnesiumchloride hexahydrate (RNase Free)</b>	Sigma Aldrich, USA Lot 122H0201

#### 3.5.2. Methode

Om na te gaan of het glycatiemechanisme omkeerbaar is, worden nagels van zowel diabetespatiënten als gezonde mensen, waarvan het fructosaminegehalte gekend is,

geïncubeerd met serum van een willekeurige persoon. Dit serum bevat het fructosamine 3-kinase enzym en zou theoretisch in staat moeten zijn om de geglyceerde nageleiwitten te deglyceren. Hiertoe zijn ATP en magnesium vereist als cofactoren.

Op basis van gegevens uit de literatuur kan afgeleid worden dat voor deze assay een concentratie van 5 mMol/L ATP en 2 mMol/L MgCl<sub>2</sub> moet gehanteerd worden. Daarom wordt in eerste instantie een stockoplossing bereid die een twee keer hogere concentratie aan voorgenoemde componenten bevat, zodat deze in een 1:1 volumeverhouding met het serum kan gemengd worden om de gewenste concentratie te bekomen. Om de af te wegen hoeveelheden van zowel ATP als magnesium te berekenen, moet rekening gehouden worden met het moleculair gewicht van de dinatrium zoutvorm van ATP (MW: 551.14 g/mol) en deze van magnesiumchloride hexahydraat (MW: 203.3 g/mol). Er wordt respectievelijk 0.2756g en 0.0407g van de voorgenoemde componenten afgewogen om 50 mL stockoplossing te bereiden. Hierbij wordt aangelengd met gedestilleerd water.

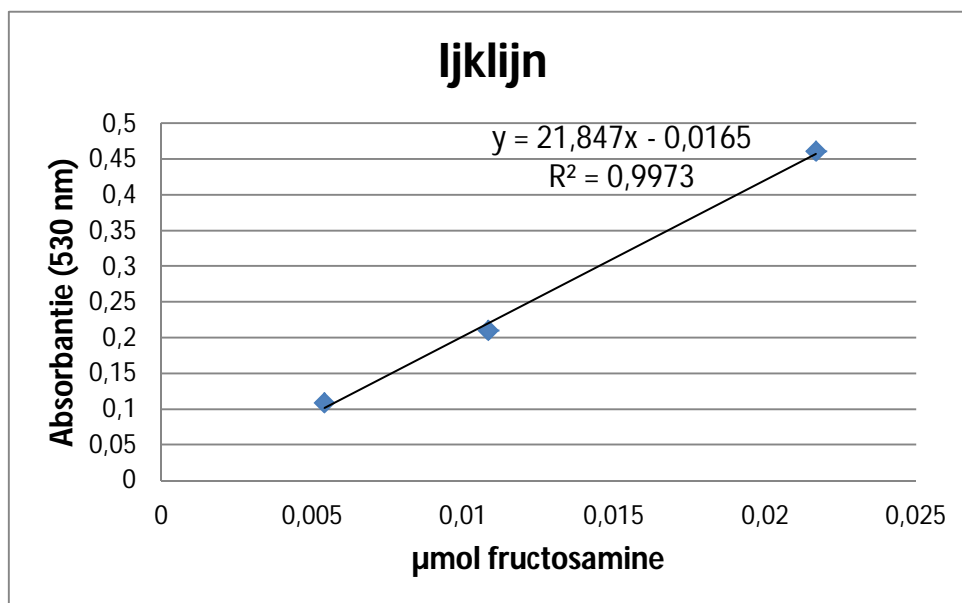
De nagelfragmenten worden na afwegen gedurende 24h geïncubeerd met een mengsel van 200 µL serum en 200 µL stockoplossing. Vervolgens worden de nagels onderworpen aan de fructosamine assay en worden de bekomen resultaten vergeleken met de initiële waarden voor het fructosaminegehalte.

## 4. RESULTATEN

### 4.1. FRUCTOSAMINEGEHALTE

#### 4.1.1. Diabetes versus niet-diabetes

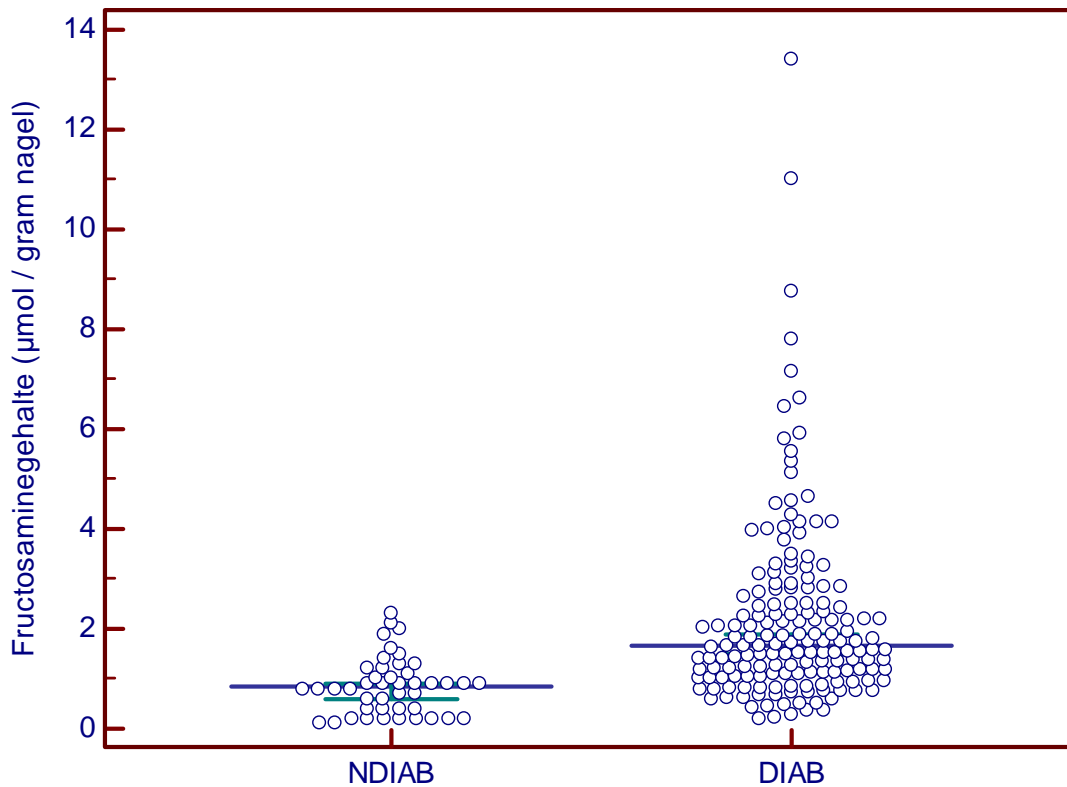
Aan de hand van een plasmastaal waarvan de fructosamine concentratie gekend is, wordt een kalibratiecurve opgesteld. Deze wordt voorgesteld in Figuur 4.1. Op basis hiervan kan bevestigd worden dat er een lineair verband bestaat tussen de gemeten absorptantie en het gehalte aan fructosamine. Vermits de concentratie wordt uitgedrukt als het aantal  $\mu\text{mol}$  fructosamine per gram nagel, wordt telkens gecorrigeerd voor het gewicht dat is afgewogen.



**Figuur 4.1: ijklijn voor bepaling van de fructosamine concentratie**

De reeds beschreven fructosamine assay wordt toegepast op nagels van zowel diabetespatiënten als gezonde individuen. De resultaten worden samengevat in een vergelijkende grafiek, waaruit kan afgeleid worden dat de concentratie aan fructosamine bij diabetici gemiddeld hoger ligt in vergelijking met gezonde individuen (zie Figuur 4.2).

Om na te gaan of het verschil in gemiddelde fructosamine concentratie tussen beide groepen statistisch significant is, wordt een onafhankelijke t-test uitgevoerd. Dit levert een p-waarde op die kleiner is dan 0.0001, waardoor kan geconcludeerd worden dat het verschil in gemiddelde fructosamine concentratie tussen beide groepen statistisch significant is. De keuze voor deze statistische test vloeit voort uit het feit dat gegevens van verschillende individuen met elkaar wordt vergeleken en bijgevolg de variabelen niet aan elkaar gelinkt zijn. Details van de uitgevoerde test worden weergegeven in Tabel 4.1.



**Figuur 4.2:** weergave van het fructosaminegehalte voor diabetici en niet-diabetici  
**NIET-DIABETES:** n= 44. **DIABETES:** n= 166.

**Tabel 4.1:** verschillende parameters en resultaten van de onafhankelijke t-test voor NDIAB  
 versus DIAB

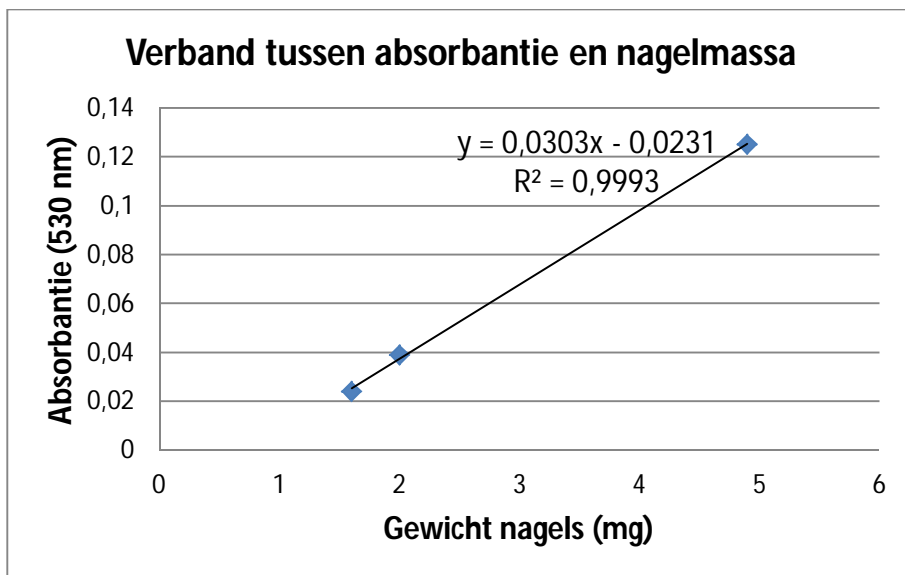
parameter	Sample 1 (NDIAB)	Sample 2 (DIAB)
Sample size	44	166
Arithmetic mean	0.848	2.21
Variance	0.317	3.54
Standard deviation	0.563	1.88
F-test for equal variances	P < 0.001	

**Welch-test (assuming unequal variances)**

difference	1.36
Standard error	0.169
Test statistic t	8.04
Degrees of freedom	205
Two-tailed probability	P < 0.0001

#### 4.1.2. Dosis

Bij 17 individuen wordt telkens een reeks van drie oplopende hoeveelheden nagel afgewogen om na te gaan of de fructosamine assay dosisafhankelijk is. Voor elk individu wordt de variatiecoëfficiënt bepaald. Gemiddeld bedraagt deze 12.8 %. Wanneer de gemeten absorptantie wordt uitgezet in functie van de afgewogen nagelmasa, kan afgeleid worden dat er sprake is van een recht evenredig verband. Een voorbeeld hiervan wordt weergegeven in Figuur 4.3. De correlatiecoëfficiënt (R) voor de voorgenoemde grootheden ligt voor de bestudeerde nagels tussen 0.939 en 1. De gemiddelde waarde is 0.976. Dit betekent dat naarmate een grotere hoeveelheid nagels wordt afgewogen, de absorptantie groter blijkt te zijn. Dit is logisch aangezien het aantal mol fructosamine, wat in de x-as staat bij de kalibratiecurve, groter is naarmate meer nagel in rekening wordt gebracht.



**Figuur 4.3:** voorstelling van de gemeten absorptantie in functie van de nagelmasa voor een willekeurig individu

#### 4.1.3. Grootte nagelfragment

Er wordt onderzocht of de grootte van de nagelfragmenten een kritische rol speelt. Hiervoor worden telkens in drievoud voor elke persoon ongeveer gelijke gewichten aan nagel afgewogen. Deze worden vervolgens in een verschillend aantal fragmenten geknipt, zodat de fragmentgrootte telkens oploopt. Hiervan wordt dan ook telkens de concentratie aan fructosamine bepaald en onderling met elkaar vergeleken door de variatiecoëfficiënt te bepalen. Gemiddeld bedraagt deze voor 20 personen 9 %. In Tabel 4.2 wordt een voorbeeld weergegeven voor een willekeurig individu.

**Tabel 4.2: reeks van fructosaminegehalten in functie van oplopende fragmentgrootte voor een willekeurig individu**

gewicht (mg)	gewicht/fragment	A (530nm)	µmol FRUC	µmol/g nagel		
3,1	1,55	0,0510	0,0031	0,996	STDEV	0,07
3,3	0,825	0,0650	0,0037	1,13	MEAN	1,07
3,3	3,3	0,0616	0,0036	1,08	CV (%)	6,35

#### 4.1.4. Invloed zeep

Onze vingernagels worden dagelijks blootgesteld aan zeep. Om aan te tonen dat het fructosamine in de nagels hierdoor niet wordt weggewassen, gebeurt de bepaling van het fructosamine gehalte zowel voor als na de blootstelling van de nagels aan zeep. Concreet wordt per persoon het fructosamine in de nagel als dusdanig bepaald, waarna van diezelfde persoon een nagelfragment gedurende enkele minuten in zeep wordt ondergedompeld. Hierna wordt opnieuw de fructosamine assay toegepast en wordt het resultaat vergeleken met de initiële waarde. Om na te gaan of er een significant verschil is, wordt een gepaarde t-test uitgevoerd. Reden voor de keuze van deze statistische test is het feit dat hier gegevens van dezelfde personen onderling worden vergeleken. De gegevens van deze test worden voorgesteld in Tabel 4.3.

**Tabel 4.3: voorstelling van de diverse parameters en resultaten voor de gepaarde t-test ter evaluatie van de invloed der zeep**

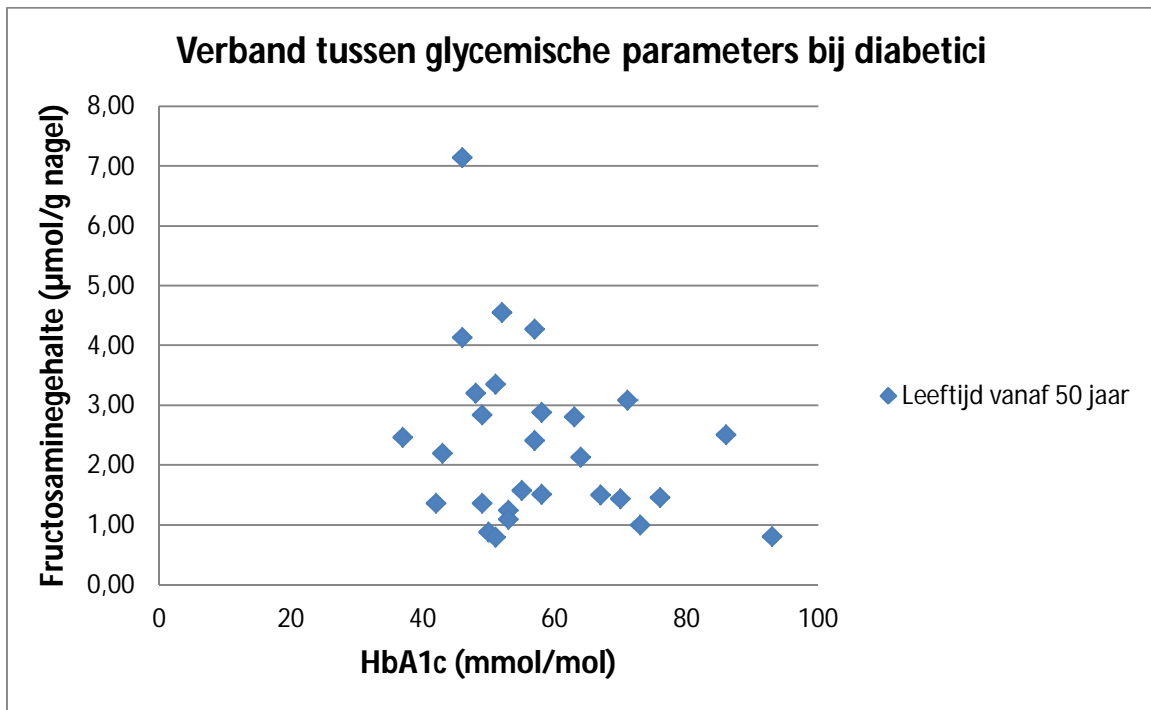
parameter	Sample 1 (Vóór)	Sample 2 (Na)
Sample size	17	17
Arithmetic mean	1.04	1.10
Variance	0.0627	0.115
Standard deviation	0.250	0.339

#### Paired samples t-test

Mean difference	0.0671
Standard deviation	0.178
Test statistic t	1.56
Degrees of freedom	16
Two-tailed probability	P= 0.140

#### 4.1.5. Verband tussen glycemische parameters

Voor de diabetespatiënten waarvan het HbA1c-gehalte bekend is, wordt het fructosaminegehalte uitgezet in functie van voorgenoemde parameter om na te gaan of er een verband bestaat tussen beide. Het resultaat hiervan wordt voorgesteld in Figuur 4.4. De conclusie die hieruit kan getrokken worden, is dat er geen enkele correlatie is tussen de beschouwde parameters. Hierbij wordt gefocust op personen die boven de 50 jaar zijn, omdat in deze leeftijdscategorie de nagelgroei reeds trager verloopt.



Figuur 4.4: voorstelling van het fructosaminegehalte in de nagel als functie van het HbA1c-gehalte (n= 28)

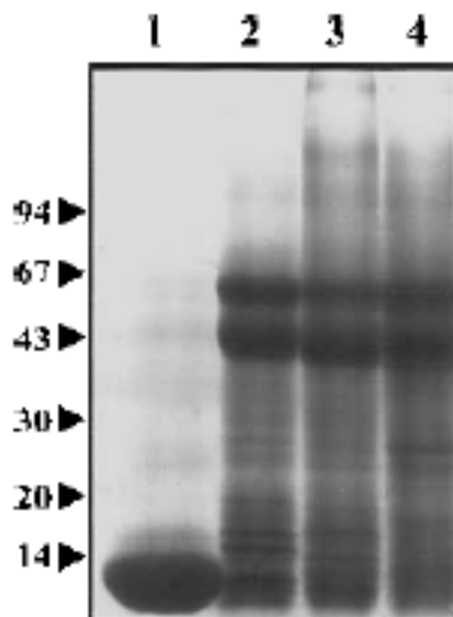
#### 4.2. EIWITEXTRACTIE

Bij de eerste uitvoering van eiwitextractie wordt via elektroforese nagegaan of er effectief eiwitten in het extract zitten. Concreet wordt in elk slotje, met uitzondering van het middelste waarin de merker wordt gebracht, het eiwitextract van een willekeurig persoon geladen. Het resultaat van de elektroforetische run wordt voorgesteld in Figuur 4.5. Hierop is duidelijk te zien dat er een bandenpatroon optreedt, dat overal gelijkaardig is. De extractiemethode die wordt toegepast, werkt dus effectief.



**Figuur 4.5: Visualisatie van de eiwitten uit het bekomen extract met behulp van SDS-PAGE**

Dit resultaat wordt vergeleken met gegevens uit de literatuur. De referentie wordt weergegeven in Figuur 4.6. Hier is eveneens een elektroforese uitgevoerd op humane nagels. Het verkregen bandenpatroon vertoont enige analogie met het eigen resultaat.



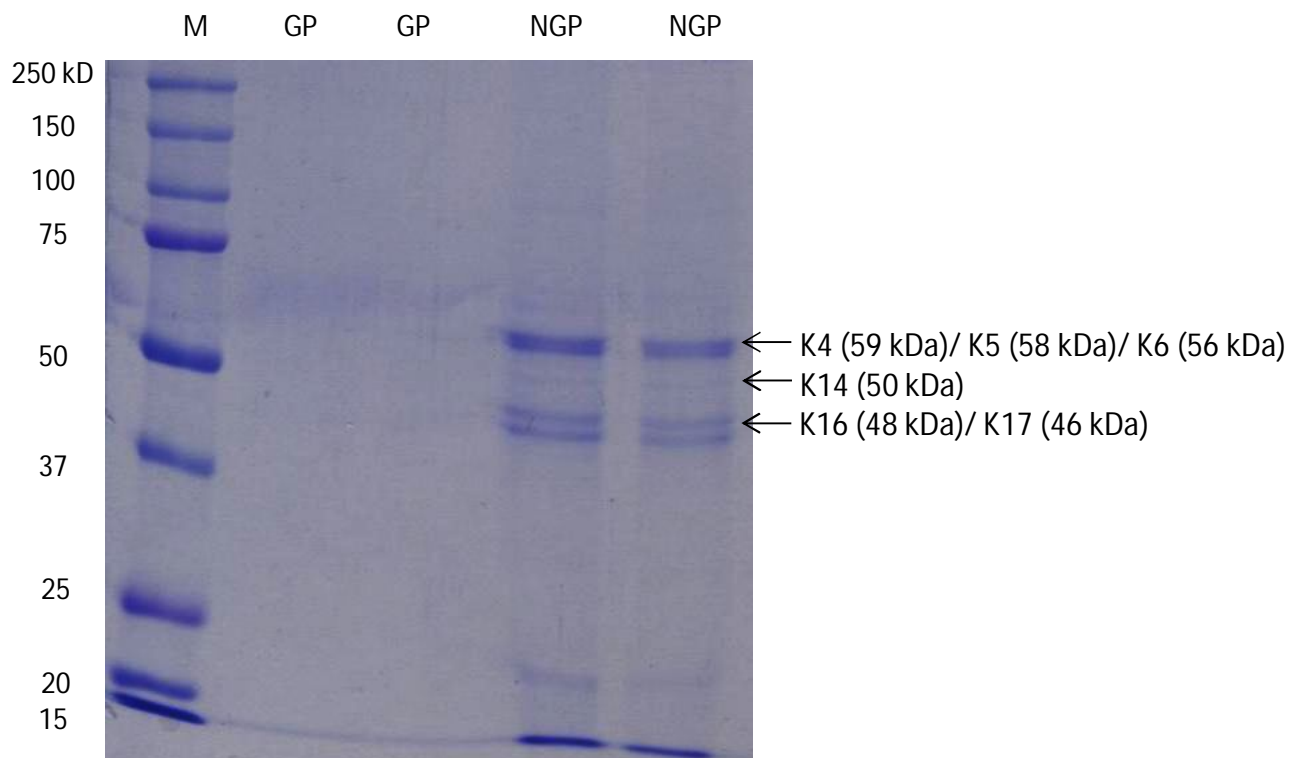
**Figuur 4.6: Referentie uit de literatuur voor SDS-PAGE. lane 4 = nagel (Nakamura et al., 2002)**

#### 4.3. BORONAAT AFFINITEITSCHROMATOGRAPHIE

Na scheiding tussen de geglyceerde en niet-geglyceerde eiwitten via boronaat affiniteitschromatografie wordt getracht deze elk afzonderlijk in beeld te brengen, zodat deze kunnen benoemd worden. Hierbij moet in het achterhoofd gehouden worden dat de

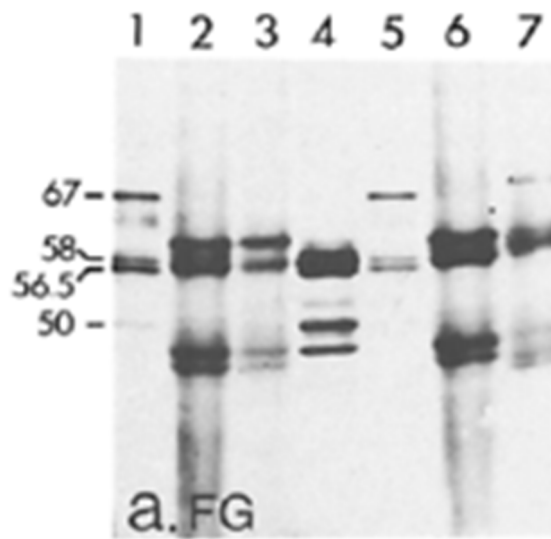


concentratie aan niet-geglyceerde eiwitten groter is dan het gehalte aan geglyceerde eiwitten. Hierdoor tonen de eerste resultaten bij visualisatie van de eiwitten via elektroforese aanvankelijk enkel een duidelijk bandenpatroon op de plaatsen waar de niet-geglyceerde eiwitten worden geladen op de gel. Dit is in tegenstelling tot de situatie voor de geglyceerde eiwitten, waarbij initieel geen duidelijk bandenpatroon tot uiting komt doordat de concentratie van het te laden extract relatief laag is. De bekomen gel wordt afgebeeld in Figuur 4.7.



**Figuur 4.7: Visualisatie van de gescheiden fracties via SDS-PAGE. M=merker; GP= Glycated Proteins; NGP= Non-Glycated Proteins**

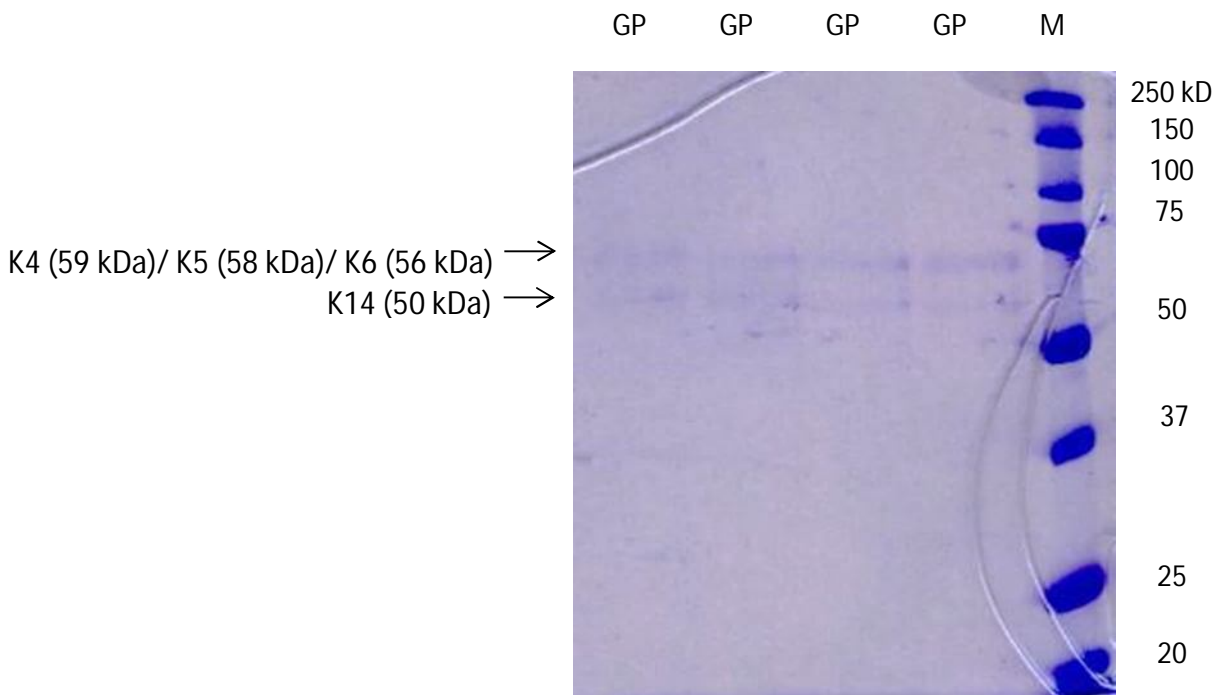
Wanneer opnieuw de vergelijking wordt gemaakt met beschikbare gegevens uit een aantal gepubliceerde artikels, kan gesteld worden dat er een sterke overeenkomst is met het verkregen bandenpatroon. Dit stelt ons in staat om de eiwitten te benoemen. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat de moleculaire gewichten van de belangrijkste keratine-eiwitten in de nagel dicht bij elkaar liggen, waardoor meerdere eiwitten op ongeveer dezelfde hoogte in het bandenpatroon terug te vinden zijn. In Figuur 4.8 wordt een voorbeeld uit de literatuur van elektroforese op nagelextract voorgesteld.



**Figuur 4.8: Referentie uit de literatuur voor SDS-PAGE: Lane 3= nagel. (Lynch et al., 1986)**

Ter optimalisatie van het bandenpatroon voor de geglyceerde eiwitten kunnen diverse aanpassingen ingevoerd worden. Eén daarvan is het opvangen van het eluens in verschillende fracties, zodat het volume per buisje kleiner is. Dit zorgt ervoor dat de eiwitconcentratie hoger ligt. Daarnaast is het ook gunstiger indien wordt vertrokken van vingernagels waarin het fructosaminegehalte zo hoog mogelijk is, zodat de fractie aan geglyceerde eiwitten ook al hoger uitvalt. De kans die er is om de geglyceerde eiwitten in beeld te krijgen, zal hierdoor groter zijn. Ook worden de slotjes van de gel maximaal gevuld om zoveel mogelijk staal op de gel te krijgen.

Om een idee te krijgen over het eiwitgehalte in de opgevangen fracties, worden deze onderworpen aan analyse met behulp van de Cobas 8000 analyser. Dit apparaat bepaalt het totaal eiwitgehalte in het eluens zoals dit gebeurt in een urinematrix. Algemeen blijkt hieruit dat de eerste fractie die wordt opgevangen, telkens de hoogste concentratie aan eiwit bevat. Om die reden wordt deze fractie gebruikt om op de gel te laden. Na veelvuldige pogingen was de opzet geslaagd om enige winst te boeken en een zichtbaar bandenpatroon te verkrijgen voor de geglyceerde eiwitten. Het resultaat wordt weergegeven in Figuur 4.9.



**Figuur 4.9: Visualisatie inhoud van de geglyceerde fractie via SDS-PAGE. M=merker; GP= Glycated Proteins**

Zoals reeds werd aangegeven, grijpt de Maillard reactie plaats tussen glucose enerzijds en een lysineresidu van eiwitten anderzijds. Om een idee te krijgen over de mogelijke glycatieplaatsen, worden de aminozuursequenties van de keratinestructuren die in het harde deel van de nagel worden teruggevonden, hier voorgesteld in Figuren 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 en 4.15. Hierbij zijn de lysineresiduen, die worden voorgesteld door de letter "k", telkens gemarkeerd.

```

1 mttcsrqlfts sssmkgscgi gggiggssr issvlaggsc rapstygggl svssrfssg
61 acglgggygg gfssssfgs gfggygggl gagfgglga gfggffaggd gllvgsekvt
121 mqnlndrlas yldkvralee anadlevkir dwyqrqrpse ikdyspyfkt iedlnkiiia
181 atienaqpil qidnarlaad dftrkyehel alrqtveadv nglrrvldel tlartdlem
241 ieglkkeelay lrknheeeml alrggtggdv nvemdaapgv dlslrnemr dqyeqmaekn
301 rrdaetwfls kteelnkeva snselvqssr sevtelrrvl qgleielqsq lsmkaslens
361 leetkgrycm qlsqigglig sveeqlaqlr cemeqqsqey qilldvktrl egeiatyrll
421 legedahlss qqasgqsyss revftsssss ssrqtrpilk eqssssfsqg qss

```

**Figuur 4.10: de aminozuursequentie van keratine 16**  
([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_005548.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_005548.2))

```

1 mtttsirqfts sssikgssgl gggssrtscr lsgglgagsc rlgsagglgs tlggssyssc
61 ysfsgsggyg ssfggvdgll aggekatomn lndrlasyld kvraleean elevkirdwy
121 qrqagppard ysqqyrtiee lqnkiltatv dnanillqid narlaaddfr tkfetegalr
181 lsveadingl rrvldeltla radlemqien lkeelaylkk nheemnalr gqvgeinve
241 mdaapgvdlr rilnemrdqy ekmaeknrkd aedwffskte elnrevatns elvqsgksei
301 selrrtmqal eielqsqslm kaslegnlae tenrycvqls qiqqlligsve eqlaqlrcem
361 eqqnqeykil ldvkrleqe iatyrrlleg edahltqykk epvttrqvrt iveevqdgkv
421 issreqvhqt tr

```

**Figuur 4.11: de aminozuursequentie van keratine 17**  
([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_000413.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000413.1))

```

1 matqtctptf stgsikglcg taggisrvss irsvgscrpv slagaagyis sarsglsglg
61 sclpgsylss echtsgfvgs gdwfcegfn gseketmqfl ndrlanylek vrqlerenae
121 lesriqewye fqipyicpdy qsyfktiedf qqkilltkse narlvlqidn aklaaddfrt
181 kyetelslrq lveadinglr rildeltlck adleaquesl keelmclkkn heeevsvlrc
241 qlgdrlnvev daappvdlnk iledmrcqye alvennrrdv eawfntqtee lnqqvvsse
301 qlqccqteii elrrtvnale ielqaghsmr nslestlaet earyssqlaq mqclisnvea
361 qlseircdle rqnqeyqvl dvkarlegei atyrhllege dcklppqpca tackpvirvp
421 svppvpcvps vpctpapqvg tqirtiteei rdgkvissre hvqsrpl

```

**Figuur 4.12: de aminozuursequentie van keratine 6**  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA76388.1>)

```

1 miarqqcvrg gprgfcgsa ivgggkrgaf ssvsmggag rcssggfgrs slynlrgnks
61 ismsvagsrq gacfggaggf gtggfgaggf gagfgtgaggf gggfgsfsgk ggggfpvcpa
121 ggigevting sltphlvei dpeiqkvrte ereqikllnn kfasfidkvq fleqqnkvl
181 tkwnllqqqt tttssknlep lfetylsvlr kqldtlgndk grlqselktm qdsvedfktk
241 yeeinkrta aendfvvlkk dvdaaylnkv eleakvdsln deinflkvly daelsqmqth
301 vsdtsvvlsm dnrnldlds iiaevraqye eiaqrskaea ealyqtkvqq lqisvdqhg
361 nkntkseia elnrmiqlr aeienikkqc qtlqsvada eqrgenalkd ahskrvelea
421 alqqakeela rmlreyqelm svklaldiei atyrkllege eyrmsgecqs avsisvsvgs
481 tstggisggl gsgsgfglss gfgsgsgsgf gfgsvsvsgs sskiiistttl nkrr

```

**Figuur 4.13: de aminozuursequentie van keratine 4**  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P19013.4>)

```

1 msrqssvsfr sggrrsfsta saitpsvsrt sftsvsrsgg gggggfgrvs lagacgvgyg
61 gsrslnlgg skrisistrg gsfrnrfag aggyyfggg agsgfgfgg agggfglggg
121 agfgggfggp gfpvcppggi qevtnqsl tnlqlidps iqrvrteere qiktlnnkfa
181 sfidkvrfl qnkvltdtkw tllqeqgkt vrqnleplfe qyinnlrrql dsivgergrl
241 dselrnmqdl vedfknkyed einkrttaen efvmlkkdvd aaymnkvele akvdalmdei
301 nfmkmffdae lsqmqthvsd tsvvlsmn rnlldsiia evkaqyeia nrsrteaesw
361 yqtkyeelqq tagrhgddlr ntkheitemn rmiqlraei dnvkkqcanl qnaiadaeqr
421 gelalkdarn klaeleealq kakqdmarrl reyqelmntk laldveiaty rklllegecr
481 lsgegvgpvn isvvtssvss gygsgsgygg glggglgggl ggglaggsgg syyssssggv
541 glggglsvgg sgfsassgrg lgvfgsggg ssssvkfvst tsssrksfk

```

**Figuur 4.14: de aminozuursequentie van keratine 5**  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P13647.3>)

```

1 mttcsrqtfs sssmkgscgi gggigggssr issvlaggsc rapstygggl svsssrffssg
61 gacglgggyg gffsssssf gsgfggggyg glgaglgggf gggfaggdgl lvgsekvmtq
121 nlnrlasyl dkvraleean adlevkirdw yqrqrpaek dyspyfktie dlrnkiltat
181 vdnanvllqi dnarlaaddf rtkyetelnl rmsveading lrrvldeltl aradlemqie
241 slkeelaylk knheemnal rgqvggdvvnv emdaapgvdl srilnemrdq yekmaeknrk
301 daeewfftkt eelnrevatn selvqsgkse iselrrtmqn leielsqsls mkaslensle
361 etkgrycmql aqiqemigsv eeqlaqlrce meqqnqeyki lldvkrtrleq eiatyrrlle
421 gedahlsssq fssgsqssrd vtsssrqirt kvmdvhdgkv vstheqvrlt kn

```

**Figuur 4.15: de aminozuursequentie van keratine 14**  
([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_000517.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000517.2))

Voor elk van de keratinestructuren wordt het gehalte aan lysine in verhouding tot het totaal aantal aminozuren berekend. Het resultaat hiervan wordt weergegeven in Tabel 4.4. Theoretisch kan gesteld worden dat het keratine potentieel sterker geglyceerd is naarmate meer lysineresiduen en dus meer potentiële glycatieplaatsen aanwezig zijn. Op basis hiervan zou kunnen gesteld worden dat de band waarbij vermoedelijk k4, k5 en k6 liggen in het geval van de geglyceerde eiwitten eerder het keratine weergeven waarvan het lysinegehalte het hoogst is, wat in dit geval k4 is. Uiteraard wordt hier geen rekening gehouden met het verschil in expressieniveau van de verschillende keratine-eiwitten. Het ene keratinetype wordt immers sterker tot expressie gebracht dan het andere.

**Tabel 4.4: weergave van de gehalten aan lysine voor elk van de nagelkeratinen**

Type keratine	Aantal lysineresiduen	Totaal aantal aminozuren	Gehalte aan lysine uitgedrukt als verhouding van aantal AZ <sup>n</sup>
<b>K4</b>	34	534	6.4%
<b>K5</b>	28	590	4.8%
<b>K6</b>	17	467	3.6%
<b>K14</b>	23	472	4.9%
<b>K16</b>	17	473	3.6%
<b>K17</b>	20	432	4.6%

#### 4.4. DEGLYCATIE

Via statistische testen wordt onderzocht of het fructosaminegehalte in nagels significant wijzigt na incubatie met serum. Tabel 4.5 geeft diverse parameters weer voor de gepaarde t-test die wordt uitgevoerd op de resultaten van 40 willekeurige personen. Hierbij wordt de fructosamine concentratie na incubatie vergeleken met de initiële waarde. Het feit dat gegevens van dezelfde personen binnen beide groepen in rekening worden gebracht,

verklaart de keuze voor een gepaarde t-test. Uit Tabel 4.5 blijkt dat de fructosamine concentratie significant daalt, gelet op de p-waarde die hier wordt bekomen.

**Tabel 4.5: voorstelling van de diverse parameters en resultaten voor de gepaarde t-test om eventuele deglycatie vast te stellen**

parameter	Sample 1 (Na)	Sample 2 (Vóór)
<b>Sample size</b>	40	40
<b>Arithmetic mean</b>	0.855	1.45
<b>Variance</b>	0.156	0.539
<b>Standard deviation</b>	0.395	0.734

**Paired samples t-test**

<b>Mean difference</b>	0.598
<b>Standard deviation</b>	0.582
<b>Test statistic t</b>	6.50
<b>Degrees of freedom</b>	39
<b>Two-tailed probability</b>	$P < 0.0001$

Om te bevestigen dat de waargenomen daling in fructosaminegehalte effectief te wijten is aan inwerking van het serum, worden eveneens nagels van willekeurige personen geïncubeerd met louter een oplossing van ATP en magnesium zonder toevoeging van serum. Hierbij wordt opnieuw een gepaarde t-test uitgevoerd, waarvan de resultaten worden voorgesteld in Tabel 4.6. Op basis van de bekomen p-waarde kan vastgesteld worden dat in dit geval geen significante afname in fructosaminegehalte waar te nemen is.

**Tabel 4.6: voorstelling van de diverse parameters en resultaten voor de gepaarde t-test bij incubatie zonder serum**

parameter	Sample 1 (Na)	Sample 2 (Vóór)
<b>Sample size</b>	4	4
<b>Arithmetic mean</b>	1.00	0.980
<b>Variance</b>	0.0864	0.104
<b>Standard deviation</b>	0.294	0.322

**Tabel 4.6: voorstelling van de diverse parameters en resultaten voor de gepaarde t-test bij incubatie zonder serum (vervolg)**

Paired samples t-test	
Mean difference	- 0.0225
Standard deviation	0.679
Test statistic t	- 0.664
Degrees of freedom	3
Two-tailed probability	P = 0.554

Voor de gebruikte serumstalen waarvan de gegevens werden genoteerd, wordt het fructosaminegehalte bepaald met behulp van de Modular-P chemistry analyzer (Roche Diagnostics, Vilvoorde, België). Vervolgens worden deze gegevens uitgezet tegenover de afname aan fructosamine in de bestudeerde nagels. Deze afname geeft immers een indicatie over de enzymactiviteit van het fructosamine 3-kinase in het betreffende serumstaal. Dit resulteert voor 17 stalen in een correlatiecoëfficiënt (R) die 0.0821 bedraagt. Dit betekent dat er op het eerste zicht geen verband blijkt te zijn tussen de enzymactiviteit van het fructosamine 3-kinase en het fructosaminegehalte in het serum.

In een volgende stap wordt nagegaan of er eventueel een correlatie terug te vinden is tussen de enzymactiviteit van het fructosamine 3-kinase enerzijds en glycemische parameters anderzijds. Hiertoe wordt de afname in fructosaminegehalte van de nagels enerzijds uitgezet in functie van de glycemie van de gebruikte serumstalen. Anderzijds wordt ook het HbA1c-gehalte bepaald voor de patiënten waarvan serumstalen werden gebruikt en waarvoor EDTA-stalen beschikbaar waren. De bepaling gebeurt met behulp van de Adams A1c HA 8160 analyser (Menarini, Zaventem, België) en het resultaat wordt uitgedrukt in mmol/mol. Wanneer de glycemie als onafhankelijke variabele wordt beschouwd, bedraagt de correlatiecoëfficiënt 0.593 (n= 9). Dit wijst opnieuw op een vrij zwakke correlatie tussen de beschouwde grootheden.

Wanneer echter de afname aan fructosamine in de nagels als functie van het HbA1c-gehalte (n= 8) wordt uitgezet, blijkt de correlatie (R= 0.723) sterker te zijn in vergelijking met

de situatie waarin de glycemie of het fructosaminegehalte als onafhankelijke variabele wordt beschouwd.

Er wordt ook meervoudige regressie toegepast, waarbij naast één van voorgenoemde glycemische parameters ook het geslacht van de patiënten waarvan serum werd gebruikt, als onafhankelijke variabele in rekening wordt gebracht. De resultaten hiervan worden voorgesteld in Tabellen 4.7, 4.8 en 4.9. Op basis van de meervoudige correlatiecoëfficiënten kan vastgesteld worden dat de associatie tussen de beschouwde grootheden sterker is wanneer ook het geslacht in rekening wordt gebracht. Dit betekent dat ook deze parameter een zekere rol speelt. Wanneer echter naar de p-waarden wordt gekeken bij de F-test, blijkt dat de correlatie in elk van de uitgewerkte situaties niet statistisch significant is. Het gaat hier echter om een beperkt aantal resultaten.

**Tabel 4.7: resultaten voor meervoudige regressie met geslacht en fructosaminegehalte als onafhankelijke variabelen; n= 16**

Multiple regression	
Coefficient of determination R <sup>2</sup>	0,0602
R <sup>2</sup> -adjusted	-0,0844
Multiple correlation coefficient	0,245
Residual standard deviation	0,235

Independent variables	Coefficient	Stnd. Error	r <sub>partial</sub>	t	P
(Constant)	0,619				
GENDER	0,103	0,122	0,228	0,844	0,414
FRUC	-0,000442	0,00135	-0,0908	-0,329	0,748

Analysis of variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	0,0460	0,0230
Residual	13	0,719	0,0553

F-ratio	0,4160
Significance level	P=0,668



Tabel 4.8: resultaten voor meervoudige regressie met geslacht (GENDER) en glycemie (GLUC) als onafhankelijke variabelen; n= 8

**Multiple regression**

<b>Coefficient of determination R<sup>2</sup></b>	0,665
<b>R<sup>2</sup>-adjusted</b>	0,531
<b>Multiple correlation coefficient</b>	0,816
<b>Residual standard deviation</b>	0,130

<b>Independent variables</b>	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>r<sub>partial</sub></b>	<b>t</b>	<b>P</b>
<b>(Constant)</b>	0,778				
<b>GENDER</b>	0,226	0,103	0,700	2,19	0,0802
<b>GLUC</b>	-0,00233	0,00192	-0,477	-1,21	0,279

**Analysis of Variance**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>
<b>Regression</b>	2	0,168	0,0839
<b>Residual</b>	5	0,0844	0,0169

**F-ratio** 4,97

**Significance level** P = 0,065

Tabel 4.9: resultaten voor meervoudige regressie met geslacht en HbA1c als onafhankelijke variabelen; n= 8

**Multiple regression**

<b>Coefficient of determination R<sup>2</sup></b>	0,590
<b>R<sup>2</sup>-adjusted</b>	0,426
<b>Multiple correlation coefficient</b>	0,768
<b>Residual standard deviation</b>	0,132

<b>Independent variables</b>	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>r<sub>partial</sub></b>	<b>t</b>	<b>P</b>
<b>(Constant)</b>	0,847				
<b>GENDER</b>	0,0873	0,0972	0,373	0,899	0,410
<b>HBA1C</b>	-0,00753	0,00348	-0,695	-2,16	0,0830

**Analysis of Variance**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>
<b>Regression</b>	2	0,125	0,0622
<b>Residual</b>	5	0,0866	0,0173

**F-ratio** 3,59

**Significance level** P= 0,108

## 5. DISCUSSIE

In eerste instantie heeft deze thesis aangetoond dat het fructosaminegehalte in nagels bij patiënten die aan diabetes lijden, gemiddeld hoger ligt dan bij gezonde personen. Dit is in analogie met de gegevens uit de literatuur voor wat betreft het fructosaminegehalte in serum (*Baker et al., 1983; Negoro et al., 1988; Mosca et al., 1987*). De verklaring hiervoor is uiteraard te vinden in het feit dat de glycemie bij diabetici langdurig verhoogd is, wat resulteert in niet-enzymatische glycatie van eiwitten, waarvan fructosamine het resultaat is. Dit gegeven opent uiteraard perspectieven om fructosamine als parameter te gebruiken in de controle van diabetes.

Een nieuw gegeven dat hier wordt belicht, is uiteraard het feit dat een verhoogde graad van glycatie niet enkel geldt voor serumeiwitten, zoals hemoglobine en albumine. Hetzelfde lijkt ook te gelden voor de keratine-eiwitten waaruit het harde gedeelte van de nagel is opgebouwd. Dit betekent dat de mogelijkheid zich stelt om bloedafname terug te dringen en zelfs volledig te vervangen door analyse van nagels. Dergelijk biologisch materiaal is veel eenvoudiger om te collecteren en is ook interessant in kader van diagnostisering en controle van diabetes in ontwikkelingslanden, waar diabetes een groeiend probleem vormt (*Shaw et al., 2010*).

Onderzoek naar het belang van de nagelmasa waarop de fructosamine assay wordt uitgevoerd, resulteerde in een gemiddelde variatiecoëfficiënt die zo'n 13 % bedraagt. In het geval van variërende fragmentgrootte werd een variatiecoëfficiënt van 9 % bereikt. Deze waarden lijken op het eerste zicht misschien groot vanuit analytisch standpunt, maar deze resultaten moeten echter in de juiste context geplaatst worden. Hierbij moet het volgende in acht genomen worden: Vrijwel alle diabetespatiënten beschikken thuis over een glucosemeter, waarmee zij dagelijks hun glucosespiegel meten (*American diabetes association, 2004*). Hoewel dergelijke vorm van zelfmonitoring routine is voor deze mensen, is ook hier sprake van een aanzienlijke variabiliteit in de gemeten glycemie. Diverse factoren dragen hiertoe bij.

In eerste instantie is er een zekere variabiliteit tussen de verschillende types glucosemeters onderling. Dit werd onder andere bestudeerd door *Brunner et al (1989)*, waarbij werd aangetoond dat elk type glucosemeter een slechts optimale meetprestatie

vertoont in een welbepaald glycemisch gebied. Dit betekent dat de nauwkeurigheid van de gemeten glycemie afhankelijk is van de grootte van de meting. Bij vergelijking met een referentiemethode bleek uit de studie van *Brunner et al* bovendien dat het grootste deel van de metingen binnen een marge van maar liefst 20 % ten opzichte van de referentiewaarde lagen. *Alto et al. (2002)* hebben eveneens onderzoek verricht naar de nauwkeurigheid van resultaten die worden bekomen via zelfmonitoring. Hier werd eveneens vastgesteld dat het grootste deel van de metingen, met name 84 %, binnen een marge van 20 % ten opzichte van een controlewaarde lagen. Meer specifiek vertoonde 53 % van de zelfmetingen een fout in de grootte-orde van 0 tot 10 %, terwijl 31 % van de resultaten een fout in de grootte-orde van 10 tot 20 % gaf. Voor de overige 16 % was de afwijking ten opzichte van de controlewaarde zelfs groter dan 20 %.

Een andere factor waarvan het resultaat afhangt, is de persoon die de glucosemeting uitvoert. Iedereen heeft immers een andere manier van bloedprikken. Bovendien is het resultaat van dergelijke glucosemeting afhankelijk van het type bloed waarop de analyse wordt uitgevoerd. Het is namelijk zo dat plasma 15 à 20 % meer glucose bevat dan vol bloed (*American Diabetes Association, 2003*). Voor een correcte interpretatie van de glycemie is het dan ook belangrijk te weten of een glucosemeter resultaten voor plasma of vol bloed weergeeft.

Ondanks de variabiliteit vormt zelfmonitoring van de glucosespiegel een belangrijke factor in de behandeling van diabetes (*Goldstein et al., 1995*). Het doel hierbij is om de glycemie nauwgezet te volgen, zodat deze tijdig kan bijgestuurd worden door de nodige maatregelen te nemen, zoals aanpassing van voeding, fysieke activiteit en medicatie. Studies hebben immers aangetoond dat er een direct verband is tussen de glycemie en het voorkomen alsook de progressie van diabetische complicaties (*Diabetes Control and Complications Trial, 1987*). Een intensieve controle van de glycemie, die bij voorkeur zo dicht mogelijk bij de normale waarde dient aan te leunen, is dan ook belangrijk om de gevolgen van diabetes tot een minimum te beperken.

Het gegeven dat de fructosamine assay bij toepassing op nagels een zekere variabiliteit vertoont in functie van de afgewogen nagelmasse en fragmentgrootte, hoeft dus geen gegronde reden te zijn om dergelijke analyse af te keuren. Dagelijks vertrouwen

diabetici immers op gegevens die, zoals hierboven aangetoond, ook onderhevig zijn aan talrijke factoren.

Aangezien hier op kleine schaal is aangetoond dat zeep geen invloed heeft op het fructosamine, kan gesteld worden dat bij interpretatie van het fructosaminegehalte geen rekening moet gehouden worden met de mate waarin de persoon in kwestie in contact komt met zepen.

De vaststelling dat er geen significante correlatie is tussen het gemeten fructosaminegehalte in de nagels en het HbA1c-gehalte van de desbetreffende patiënt, heeft mogelijk te maken met het feit dat de glycatieplaatsen voor de voornoemde merkers verschillend zijn. Daar waar fructosamine hoofdzakelijk het resultaat is van niet-enzymatische glycatie via lysineresiduen (*Armbruster, 1987*), ontstaat HbA1c echter door analoge reactie via de N-terminale valines van de  $\beta$ -ketens in de hemoglobinemoleculen (*International Federation of Clinical Chemistry*). Bovendien is het zo dat het fructosamine 3-kinase werkzaam is ter hoogte van lysineresiduen gelet op de hoge affiniteit voor fructoselysine (*Szwergold et al., 2001*). Dit betekent dat deglycatie wel mogelijk is voor fructosamine, maar niet voor HbA1c.

Nadat de geglyceerde keratine-eiwitten in de nagel in beeld werden gebracht, is gekeken naar het lysinegehalte van de diverse keratinestructuren. Op die manier werd een verband gelegd tussen de potentiële glycatiegraad en het procentuele lysinegehalte. Bij elektroferese van de geglyceerde fractie uit de bestudeerde nagels werden keratine-eiwitten K4, K5, K6 en K14 gedetecteerd. De moleculaire gewichten van K4, K5 en K6 liggen dicht bij elkaar, waardoor eenduidige differentiatie via SDS-PAGE moeilijk was, maar op basis van de overeenkomstige gehalten aan lysine kan een hypothese opgesteld worden dat het hier vooral om K4 zou gaan, vermits deze het hoogste lysinegehalte heeft. Samen met K14, dat wel duidelijk werd gedetecteerd, heeft K4 het hoogste lysinegehalte van alle keratine-eiwitten die in de nagel voorkomen. Het lijkt dan ook logisch dat deze in belangrijkste mate geglyceerd zijn, vermits deze een groter gehalte aan potentiële glycatieplaatsen bezitten. Er moet echter ook rekening gehouden worden met het verschil in expressieniveau. Het is immers mogelijk dat keratine-eiwitten met een lager lysinegehalte in grotere mate tot expressie worden gebracht en bijgevolg een grotere hoeveelheid hiervan geglyceerd is.

In laatste instantie hebben de experimenten omtrent deglycatie het vermoeden doen rijzen dat dergelijk proces niet onherroepelijk is. Deglycatie van nagels op kleine schaal gaf immers positieve resultaten. Het kan dus zeer interessant zijn naar de toekomst toe om verder onderzoek te verrichten naar het potentieel van het fructosamine 3-kinase om glycatie van eiwitten te beperken en eventueel zelfs volledig te vermijden. Er werd in deze thesis ook vastgesteld dat er een zekere correlatie is tussen de enzymactiviteit van het FN3K als afhankelijke variabele en glycemische parameters in combinatie met het geslacht als onafhankelijke variabelen. Toch blijkt dit op basis van de p-waarden niet statistisch significant te zijn. Om sluitende conclusies te trekken moeten deze experimenten op grotere schaal uitgevoerd worden.

## 6. BESLUIT

Hoewel deze masterproef enkele perspectieven heeft geopend omtrent diabetes, zijn er nog vele wegen die moeten onderzocht worden. Het gaat hier om onderzoek dat niet enkel een grote impact kan hebben op de manier waarop dit ziektebeeld wordt gecontroleerd. Ook kunnen er nieuwe mogelijkheden gevonden worden om de progressie van het ziektebeeld aan te pakken.

Er is vastgesteld dat het fructosaminegehalte in de vingernagels bij diabetici gemiddeld hoger ligt dan bij gezonde personen. Bovenop het feit dat de vastgestelde variabiliteit bij deze analyse aanvaardbaar is, biedt deze methode alleen maar voordelen ten opzichte van de huidige analyses die routinematig worden toegepast. Er moet hierbij vooral op globaal niveau gekeken worden. Diabetes is immers niet langer een ziekte van de Westerse wereld, maar is ook op weg om een ware epidemie te vormen in ontwikkelingsgebieden (Hu, 2011). Met oog op deze ontwikkelingslanden kunnen de eenvoud en de lage kostprijs van de fructosamine assay belangrijke argumenten zijn om deze parameter te bepalen in de controle van diabetes. Bloedafnames zijn ook allerm minst populair in bepaalde culturen, wat in de meeste Sub-Saharische landen het geval is. Daarom kan analyse van vingernagels ter vervanging van bloedafname ook de drempel verlagen voor patiënten om zich te laten testen.

De proeven omtrent deglycatie die hier werden uitgevoerd, scheppen hoge verwachtingen. Het fructosaminegehalte in de bestudeerde nagels bleek aanzienlijk lager te zijn na incubatie met serum. Als deglycatie van organen mogelijk zou worden, moet de aanpak van diabetes volledig herzien worden. Wie weet wordt het ooit mogelijk om een nier of een oog te deglyceren en op die manier complicaties als diabetische nefropathie en retinopathie te genezen.

Het dient aangeraden te worden om genetische variabiliteit in het fructosamine 3-kinase verder bloot te leggen. Inzicht krijgen in mogelijk polymorfisme van het enzym zou immers een belangrijke waarde kunnen hebben om een onderscheid te maken tussen 'snelle' en 'trage' deglyceerders. Op basis van dergelijke informatie wordt het mogelijk om het risico op complicaties in te schatten voor de individuele patiënt.

## 7. LITERATUURLIJST

Alto, W.A.; Meyer, D.; Schneid, J.; Bryson, P. (2002). Assuring the accuracy of home glucose monitoring. *Journal of the American board of family medicine*, 15, 1-6.

American Diabetes Association (2004). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, 27 (suppl. 1), 15–35.

Armbruster, D.A. (1987). Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. *Clin. Chem.*, 33, 2153-2163.

Bragulla, H.H.; Homberger, D.G. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of anatomy*, 214, 516-559.

Brunner, G.A.; Ellmerer, M.; Sendlhofer, G.; Wutte, A.; Trajanoski, Z.; Schaupp, L.; Quehenberger, F.; Wach, P.; Krejs, G.; Pieber, T.R. (1998). Validation of home blood glucose meters with respect to clinical and analytical approaches. *Diabetes Care*, 21, 585-590.

Bruns, D.E.; Knowler, W.C. (2009). Stabilization of glucose in blood samples: why it matters. *Clin. Chem.*, 55, 850-852.

Cashman, M.W.; Sloan, S.B. (2010). Nutrition and nail disease. *Clin Dermatol.*, 28, 420-425.

De Berker, D.; Baran, R.; Holzberg, M.; Thomas, L. (2012). Science of the nail apparatus. Baran & Dawber's Diseases of the Nails and their Management, Fourth Edition, John Wiley & Sons, chapter 1, 1-50.

De Berker, D.A.R.; André, J.; Baran, R. (2007). Nail biology and nail science. *International Journal of Cosmetic Science*, 29, 241–275.

Diabetes Control and Complications Trial (DCCT): Results of feasibility study. (1987). *Diabetes Care*, 10, 1-19.

Fluckiger, R.; Woodtli, T.; Berger, W. (1984). Quantitation of glycosylated Hemoglobin by boronate affinity chromatography. *Diabetes*, 33, 73-76.

Fowler, M.J. (2008). Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical diabetes*, 26, 77-82.

Garfin, D.E. (2003). Essential cell biology, volume 1: cell structure, a practical approach. Gel electrophoresis of proteins. John Davey and Mike Lord, Oxford University Press, Oxford UK, 197-268.

Goldenberg, R.M.; Cheng, A.Y.Y.; Punthakee, Z.; Clement, M. (2011). Use of Glycated Hemoglobin (A1C) in the Diagnosis of Type 2 Diabetes Mellitus in Adults. *Canadian Journal of Diabetes*, 35, 247-249.

Goldstein, D.E.; Little, R.R.; Lorenz, R.A.; Malone, J.I.; Nathan, D.; Peterson, C.M. (1995). Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care*, 18, 896-909.

Hage, D.S. (1999). Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clinical Chemistry*, 45, 593-615.

Hu, F.B. (2011). Globalization of Diabetes: The role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care*, 34, 1249-1257.

<http://diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/diagnosis/> (14 maart 2013)

<http://fungusfacts.com/fingernail-fungus/> (25 maart 2013)

<http://stattrek.com/online-calculator/t-distribution.aspx> (24 april 2013)

<http://www.aacc.org/publications/cln/2009/october/Pages/Series1009.aspx> (18 april 2013)

<http://www.acb.org.uk/docs/NHLM/HbA1c%201.pdf> (18 april 2013)

[https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/BAOSR6x70/%25%25/EN\\_URINARY-CSF%20PROTEIN.pdf](https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/BAOSR6x70/%25%25/EN_URINARY-CSF%20PROTEIN.pdf) (27 maart 2013)

[http://www.dclmexico.com/ingles/proteina\\_micro.pdf](http://www.dclmexico.com/ingles/proteina_micro.pdf) (3 april 2013)

<http://www.dermopathmd.com/Clinical%20Dermatology/Nails.ppt.pdf> (7 april 2013)

<http://www.diabetes.be/3/19/313/overdiabetes/watisdiabetes/ontstaanenpreventie.aspx> (12 maart 2013)

<http://www.idf.org/types-diabetes> (4 maart 2013)

[http://www.idf.org/webdata/docs/background\\_info\\_AFR.pdf](http://www.idf.org/webdata/docs/background_info_AFR.pdf) (6 maart 2013)



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA76388.1> (29 april 2013)

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_000413.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000413.1) (29 april 2013)

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_000517.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000517.2) (29 april 2013)

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_005548.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_005548.2) (29 april 2013)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P13647.3> (29 april 2013)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P19013.4> (29 april 2013)

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/001214.htm> (2 april 2013)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641111000488> (17 april 2013)

<http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter6/F06-21.jpg> (29 maart 2013)

[http://www.trinitybiotech.com/HbA1c\\_HB/Pages/BoronateAffinity.aspx](http://www.trinitybiotech.com/HbA1c_HB/Pages/BoronateAffinity.aspx) (21 maart 2013)

<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/principles.html> (11 maart 2013)

[http://www.who.int/bulletin/archives/79\(8\)704.pdf](http://www.who.int/bulletin/archives/79(8)704.pdf) (24 april 2013)

<http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/en/index.html> (2 maart 2013)

IFCC Standardization of HbA1c (<http://www.ngsp.org/docs/IFCCstd.pdf>)

John, G.W.; Lamb, E.J. (1993). The Maillard or browning reaction in diabetes. *Eye*, 7, 230-237.

Johnson, R.N.; Metcalf, P.A.; Baker, J.R. (1982). Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clinica Chimica Acta*, 127, 87-95.

Kaufman, F.R. (2002). Type 2 diabetes in children and young adults: a "new epidemic". *Clinical diabetes*, 20, 217-218.

Lynch, M.H.; O'Guin, M.; Hardy, C.; Mak, L.; Sun, T.T. (1986). Acidic and basic hair/nail ("hard") keratins: their colocalization in upper cortical and cuticle cells of the human hair follicle and their relationship to "soft" keratins. *The journal of cell biology*, 103, 2593-2606.

Majikela-Dlangamandla, B.; Isivwe, A.; Levitt, N. (2006). Diabetes monitoring in developing countries. *Diabetes Voice*, 51, 28-31.

Marshall, T.; Abbott, N.J.; Fox, P.; Williams, K.M. (1995). Protein concentration by precipitation with pyrogallol red prior to electrophoresis. *Electrophoresis*, 16, 28-31.

Mbanya, J.C.; Motala, A.; Sobngwi, E.; Assah, F.; Enoru, S. (2010). Diabetes in sub-Saharan Africa. *Lancet*, 375, 2254-2266.

Moll, R.; Divo, M.; Langbein, L. (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*, 129, 705-733.

Mosca, A.; Carenini, A.; Zoppi, F.; Carinelli, A.; Banfi, G.; Cerlotti, F.; Bonini, P.; Pozza, G. (1987). Plasma protein glycation as measured by fructosamine assay. *Clin. Chem.*, 33, 1141-1146.

Nakamura, A.; Arimoto, M.; Takeuchi, K.; Fujii, T. (2002). A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species. *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 569-572.

Nitin, S. (2010). HbA1c and factors other than diabetes mellitus affecting it. *Singapore Med. J.*, 51, 616-622.

Orsonneau, J.L.; Douet, P.; Massoubre, C.; Lustenberger, P.; Bernard, S. (1989). An improved pyrogallol red-molybdate method for determining total urinary protein. *Clin. Chem.*, 35, 2233-2236.

Peppas, M.; Uribarri, J.; Vlassara, H. (2003). Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. *Clinical Diabetes*, 21, 186-187.

Sacks, D.B. (2011). A1c versus glucose testing: a comparison. *Diabetes Care*, 34, 518-523.

Sarnaik, S.A. (2005). Thalassemia and related hemoglobinopathies. *Indian journal of pediatrics*, 72, 319-324.

Shaw, J.E.; Sicree, R.A.; Zimmet, P.Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 87, 4-14.

Szwergold, B.S.; Howell, S.; Beisswenger, P.J. (2001). Human Fructosamine-3-Kinase Purification, Sequencing, Substrate Specificity, and Evidence of Activity In Vivo. *Diabetes*, 50, 2139-2147.

Tarin, S.M.A. (2010). Global 'epidemic' of diabetes. *Nishtar Medical Journal*, 2, 56-60.

Watanabe, N.; Kamel, S.; Ohkubo, A.; Yamanaka, M.; Ohsawa, S.; Makino, K.; Tokuda, K. (1986). Urinary protein as measured with a Pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin. Chem.*, 32, 1551-1554.

Weatherall, D.J.; Clegg, J.B. (2001). Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organisation*, 79, 704-712.

