



FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

Utvikling av metode for deteksjon av
karbohydrater i urin med HPAE-PAD

Development of a method for detection of
carbohydrates in urine by HPAE-PAD

Av / by

Ingeborg Lyng Rødal Kaja Berg-Hansen Tuva Marie Hall Borge

København, 2022

Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet ved Institutt for bioingeniørfag ved Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet (NTNU) våren 2022, og gjennomført under et utvekslingsopphold ved Københavns Universitet, Danmark.

Oppgaven ble gitt av faglig veileder Moschoula Lina Passali, doktorgradsstudent innen klinisk ernæring, i samarbeid med professor og leder av MS-forskningsgruppen ved Rigshospitalet, Jette Frederiksen. Prosjektet ble gjennomført til dels ved Bartholin Institutt, underlagt Patologisk avdeling på Rigshospitalet i København, og ved Dansk Multipel Sklerose Center ved Rigshospitalet Glostrup.

Vi ønsker å rette en stor takk til Lina Passali som har lagt til rette for at vi kunne gjennomføre dette prosjektet. Lina har gitt oss uvurderlig veiledning innen blant annet laboratoriearbeid, statistikk og faglig påfyll både sent og tidlig, og ikke minst gitt oss et interessant innblikk i forskningens mange gleder og frustrasjoner. Videre ønsker vi å takke Jette Frederiksen, for å ha inkludert oss i forskningsgruppen i denne perioden, og gitt oss god faglig veiledning. En takk rettes også til Seniorforsker Knud Josefsen og doktorgradsstudent innen biokjemi Hasim Tekin for god hjelp og veiledning med metodeutvikling.

Avslutningsvis vil vi gi en stor takk til førstelektor ved Institutt for Bioingeniørfag, Kristin Gabestad Nørsett, PhD, som har vært vår prosessveileder i forbindelse med denne oppgaven. Hennes tilbakemeldinger og råd ga oss motivasjon da vi sto fast, og hun har sørget for et godt faglig samarbeid mellom NTNU og Københavns Universitet.

Ingeborg Lyng Rødal

Ingeborg Lyng Rødal

Kaja Berg-Hansen

Kaja Berg-Hansen

København, 12 juni 2022

Tuva M.H. Borge

Tuva Marie Hall Borge

Sammendrag

Bakgrunn: Multippel sklerose (MS) er en kronisk autoimmun sykdom hvor myelinet og aksonene i sentralnervesystemet blir angrepet av kroppens egne immunceller. Tidligere forskning tyder på at glutenproteiner kan øke tarmens permeabilitet for uønskede molekyler, som videre kan ha en innvirkning på utvikling og forverring av enkelte autoimmune sykdommer. Derfor ønsket vi å undersøke om en glutenfri diett hos MS-pasienter kan gi lavere tarmpermeabilitet, og om dette kan ha en positiv innvirkning på sykdommen. Hovedformålet med denne oppgaven var å etablere en kromatografisk analysemetode for å detektere konsentrasjonen av sukkerartene mannitol, xylose og lactulose i urinen til forskningsprosjektets deltakere. Metoden skal benyttes til videre forskning, for å måle permeabilitet og absorpsjon i tarmen hos deltakerne. I tillegg var det ønskelig å etablere en metode for å kvantifisere gluteninntaket til forskningsprosjektets deltakere.

Metoder: Metoden som ble benyttet til deteksjon av sukkerartene var High-Performance Anion-Exchange kromatografi med Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD). Det ble benyttet to ulike kolonnesett; PA20 og MA1. Ved bruk av disse metodene, ønsket vi å sammenligne permeabilitet og absorpsjon i tarmen hos en intervensjonsgruppe (n= 40) og en kontrollgruppe (n=36), begge i tidlig stadier av MS-sykdom. Intervensjonsgruppen fulgte en glutenfri diett, og kontrollgruppen fortsatte med sin vanlige diett. Basert på et matvarefrekvens-spørreskjema ble det også utviklet en metode for beregning av gluteninntaket til hver pasient, kalt glutenscore.

Resultater: Resultatene fra optimaliseringen av metode for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonne viste at de ideelle betingelsene var med en flow-hastighet på 0,40 mL/min, temperatur på 30° C og med en bufferløsning med NaOH-konsentrasjon på 480mM. Det ble beregnet god gjennomsnittlig recovery for mannitol og xylose, (m: 99,60%, x: 99,21%). Gjennomsnittlig CV for detektert konsentrasjon av mannitol og xylose mellom parallellene av pasientprøver var også god (m: 1,3%, x: 1,4%). Utprøvnings som ble gjort for å optimalisere kvantifisering av lactulose på PA20-kolonnen var ikke tilstrekkelig. Ved analyse på ufortynnet urin ble PA20-kolonnen overbelastet, mens ved analyse av fortynnete urinprøver var lactulose ikke lenger detekterbart grunnet for lav konsentrasjon. I dette

prosjektet var det derfor kun mannitol og xylose i pasientenes urin som ble detektert. Det ble i tillegg utviklet en metode for å beregne glutenscore for hver deltaker. Det er imidlertid knyttet usikkerhet til hvor godt egnet denne metoden er til å kvantifisere gluteninntaket til pasientene.

Konklusjon: Resultatene i dette prosjektet er en del av et større forskningsprosjekt, og det må gjøres flere analyser før en kan vurdere effekten av glutenfri kost hos pasienter i tidlige stadier av MS-sykdom. Videre i forskningsarbeidet er det tenkt at resultatene fra den kromatografiske kvantifiseringen av sukkerartene i urinen, skal brukes til å undersøke om det er en signifikant forskjell i tarmpermeabilitet mellom intervensjonsgruppen og kontrollgruppen, og sammenligne dette med friske kontrollpersoner.

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease in which the myelin and axons in the central nervous system are attacked by one's own immune cells. Previous research has shown that gluten proteins can increase the intestinal permeability to unwanted molecules, which in turn may affect the development and worsening of certain autoimmune diseases. Therefore, we wanted to investigate whether a gluten free diet among MS patients can lead to a decrease in intestinal permeability, and if this will have a positive effect on their illness. The main purpose of this project was to establish a chromatographic method of detecting the concentration of three sugars (mannitol, xylose and lactulose) in the participants' urine. The established method will be used in future research, to measure the participants' intestinal permeability and absorption. Furthermore, a method for calculating the intake of gluten for each participant during the project period was developed.

Methods: The method that was used to detect the sugars was High-Performance Anion-Exchange chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD). Two different sets of columns were used, the PA20 and MA1. With these methods we wished to compare the permeability and absorption of the intestine for participants in an intervention group (n=40) and a control group (n=36), both in early stages of MS disease. The intervention group followed a gluten free diet, while the control group followed their regular diet. Based on food frequency questionnaires, a method for calculating the intake of gluten for each participant, called a gluten score, was developed.

Results: The results of the optimization of the method for detecting mannitol and xylose by HPAE-PAD and MA1 column showed that the ideal conditions were with a flow rate of 0,40 mL/min, a temperature of 30°C, and an eluent with a concentration of 480 mM. The average calculated recovery of mannitol and xylose in the samples with the MA1 column was found to be satisfactory (m: 99,60%, x: 99,21%). The average CV for detected concentration of mannitol and xylose between parallels of patient samples was also good (m: 1,3%, x: 1,4 %). The tests that were done to optimize the quantification of lactulose with the PA20 column were not sufficient. When analysing undiluted urine, the PA20 column became overloaded, and when diluted urine samples were analysed, the lactulose was no longer detectable due to low concentration. Therefore, only mannitol and xylose in the urine of patients were detected in this project. It was also established a method for calculating each patient's gluten score,

however it is uncertain how well suited this method is for quantifying the participants' gluten intake.

Conclusion: The findings in this project are a part of a bigger research project, and various other test will be done in order to determine the effect of a gluten free diet among patients in early stages of an MS disease. Forward in the research, the results from the chromatographic quantification of the sugars in urine will be used to investigate whether there is a significant difference in intestinal permeability among the intervention group compared to the control group and compared to healthy controls.

Forkortelser

CSF - Cerebrospinalvæske

CV – Variasjonskoeffisient

DIS - Disseminering i sted

DIT - Disseminering i tid

EBV - Epstein Barr Virus

EDSS score – Expanded Disability Status Scale score

FFQ – Food Frequency Questionnaire

FU – Follow Up

GF - Glutenfri

HPAE-PAD - High Performance Anion Exchange kromatografi–Pulsed Amperometric Detection

IS – Intern standard

IQR – Interquartile range

L/M-test – Lactulose/Mannitol-test

L/M-ratio - Lactulose/Mannitol-ratio

MHC II – Major Histocompatibility Complex II

MR - Magnetisk resonans undersøkelse

MS - Multippel sklerose

NaOH - Natriumhydroksid

PPMS – Primær progressiv MS

PRMS – Progressiv relapserende MS

R²- Determinasjonskoeffisient

RRMS – Relapserende remitterende MS

SPMS – Sekundær progressiv MS

SD - Standardavvik

T1DM – Type 1 diabetes mellitus

TJ – Tight junctions

Innholdsfortegnelse

FORORD	II
SAMMENDRAG	III
ABSTRACT	V
FORKORTELSER	VII
INNHOLDSFORTEGNELSE	IX
1.0 INNLEDNING	1
1.1 MULTIPPEL SKLEROSE.....	1
1.1.1 <i>Epidemiologi</i>	2
1.1.2 <i>Årsaker til multippel sklerose</i>	3
1.1.3 <i>Inndeling av multippel sklerose</i>	3
1.1.4 <i>Attakker og symptomer</i>	4
1.1.5 <i>Diagnostikk</i>	5
1.1.6 <i>Behandling</i>	6
1.2 TARMENS PERMEABILITET OG AUTOIMMUNE SYKDOMMER	7
1.2.1 <i>Tarmens oppbygning og permeabilitet</i>	7
1.2.2 <i>Tarmens påvirkning på multippel sklerose</i>	9
1.2.3 <i>Tidligere forskning; gluten og tarmpermeabilitet</i>	9
1.3 MÅLING AV TARMPERMEABILITET	13
1.3.1 <i>Måling av tarmpermeabilitet ved bruk av sukkertest</i>	13
1.3.2 <i>High Performance Anion Exchange Chromatography med Pulsed Amperometric Detection</i>	14
1.3.3 <i>Avlesning fra kromatogram</i>	17
1.3.4 <i>Forskjeller mellom PA20-kolonnen og MA1-kolonnen</i>	18
1.4 HENSIKT MED OPPGAVEN	19
2.0 MATERIALE OG METODE	20
2.1 GJENNOMFØRING AV FORSKNINGSPROSJEKTET OG REKRUTTERING AV DELTAKERE.....	20
2.1.1 <i>Oversikt over deltakere i prosjektet</i>	20
2.2 GJENNOMFØRING AV SUKKERTEST	21
2.3 OPTIMALISERING AV KROMATOGRAFIMETODE FOR DETEKSJON AV SUKKERARTER	22

2.3.1 Optimalisering av metode for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonnen	23
2.3.2 Optimalisering av metode for deteksjon av lactulose med HPAE-PAD og PA20-kolonnen.....	24
2.4 METODE FOR ANALYSERING AV PASIENTPRØVER MED HPAE-PAD.....	25
2.4.1 Kalibrering av metode deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonnen.....	25
2.4.2 Kvalitetskontroll av metoden for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonnen	27
2.4.3 Fortynning og analysering av pasientprøver for kvantifisering av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonnen	27
2.4.4 Validering av metode for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonnen.....	28
2.5 SPØRRESKJEMAER OG UTARBEIDELSE AV GLUTENSCORE	29
2.6 DATABEHANDLING.....	30
3.0 RESULTATER.....	32
3.1 BAKGRUNN FOR OPTIMALISERING AV DETEKSJONSMETODE FOR MANNITOL, XYLOSE OG LACTULOSE I URIN	32
3.2 OPTIMALISERING AV METODEN FOR DETEKSJON AV MANNITOL OG XYLOSE MED HPAE-PAD OG MA1-KOLONNE	34
3.2.1 Ved analyse av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonne fører økt flow-hastighet til topper med økt høyde, smalere bredde, lavere areal og kortere retensjonstid	35
3.2.2 Utprøvd isokratisk NaOH-konsentrasjon er foretrukket framfor utprøvd gradient med HPAE-PAD og MA1-kolonne	38
3.3 OPTIMALISERING AV METODEN FOR DETEKSJON AV LACTULOSE MED HPAE-PAD OG PA20-KOLONNEN.....	40
3.3.1 Ved analyse av lactulose med HPAE-PAD og PA20-kolonnen fører økt flow-hastighet til kortere retensjonstid, og topper med økt høyde, smalere bredde og lavere areal.....	40
3.3.2 Ved analyse av lactulose med HPAE-PAD og PA20-kolonne fører økt NaOH-konsentrasjon til kortere retensjonstid, og topper med økt høyde, smalere bredde og større areal	43

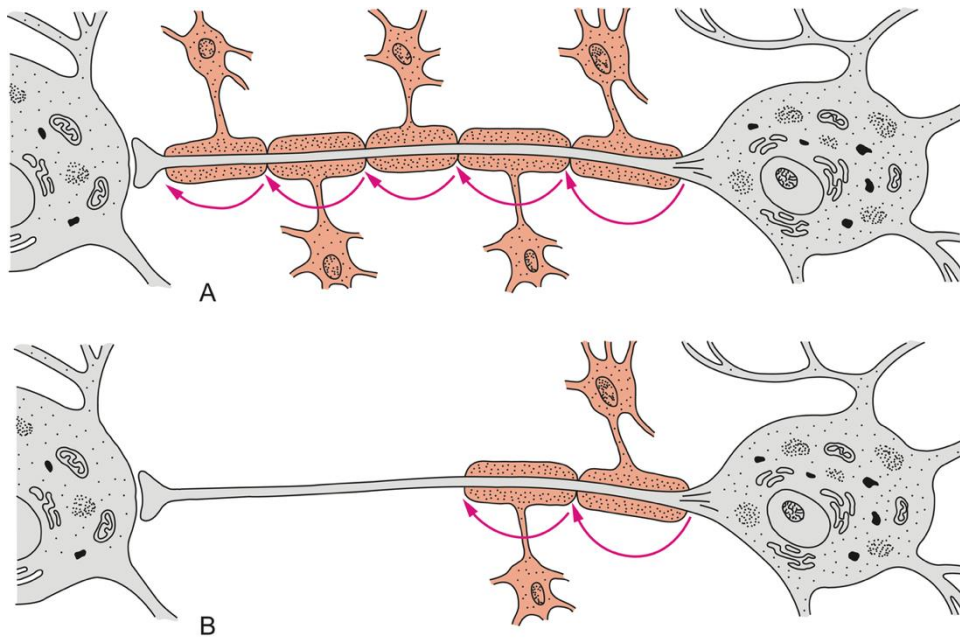
3.3.3	<i>Ved analyse av lactulose med HPAE-PAD og PA20-kolonnen fører økt temperatur til kortere retensjonstid, og topper med økt høyde, smalere bredde og større areal</i>	46
3.4	AREAL AV TOPP BENYTTES FOR Å BESTEMME KONSENTRASJON AV MANNITOL OG XYLOSE VED ANALYSE MED HPAE-PAD OG MA1-KOLONNE	49
3.5	INGEN UTPRØVD INTERN STANDARD ER EGNET TIL ANALYSE AV SUKKERARTER MED HPAE-PAD, OG HUMAN URINPRØVE ER EGNET SOM DAGLIG KONTROLL	51
3.6	ULIK DIURESE HOS PASIENTENE KREVER ULIK FORTYNNINGSGRAD AV URINPRØVENE	54
3.7	VALIDERING AV ANALYSEMETODEN FOR DETEKSJON AV MANNITOL OG XYLOSE MED HPAE-PAD VISER AT DET ER LITEN VARIASJON MELLOM PARALLELLENE, OG AT METODEN HAR GOD RECOVERY AV ANALYTTENE	54
3.8	PASIENTPRØVER	57
3.8.1	<i>Oversikt over pasientkarakteristikk ved baseline</i>	57
3.8.2	<i>Ingen signifikant forskjell i masse mannitol og xylose for pasientene i intervensjonsgruppen og kontrollgruppen, samt mellom baseline og follow-up innad i gruppene</i>	59
3.8.3	<i>Beregnet glutenscore for pasienter i intervensjonsgruppen og kontrollgruppen</i>	61
4.0	DISKUSJON	64
4.1	FORSKNING PÅ MULTIPPEL SKLEROSE	64
4.1.2	<i>Vurdering av pasientkarakteristika ved baseline</i>	66
4.2	SUKKERTEST SOM MÅLING AV TARMPERMEABILITET	67
4.2.1	<i>Vurdering av glutenscore</i>	68
4.3	VALIDERING AV METODEN	70
4.3.1	<i>Kalibrering av metode for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonne</i>	70
4.3.2	<i>Kontroll av metode for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonne</i>	71
4.3.3	<i>Recovery og matrikseffekt</i>	73
4.3.4	<i>Vurdering av pasientprøvenes presisjon</i>	74
4.4	METODOLOGISKE BETRAKTNINGER KNYTTET TIL UNDERSØKELSE AV TARMPERMEABILITET MED HPAE-PAD	74
4.4.1	<i>Optimalisering av metode for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonne</i>	75

<i>4.4.2 Optimalisering av metode for deteksjon av lactulose med HPAE-PAD og PA20-kolonnen.....</i>	<i>76</i>
<i>4.4.3 Fortynning av pasientprøvene slik at konsentrasjonen av lactulose er under deteksjonsnivå.....</i>	<i>78</i>
4.5 SPØRRESKJEMA SOM FORSKNINGSMETODE.....	78
4.6 KONKLUSJON OG VEIEN VIDERE	80
5.0 REFERANSER.....	81
6.0 VEDLEGG	88

1.0 Innledning

1.1 Multippel sklerose

Multippel sklerose (MS) er en nevrologisk autoimmun sykdom som karakteriseres ved at immunforsvaret angriper myelinet i sentralnervesystemet. Myelin er det fettholdige materialet som omslutter og beskytter nervecellenes aksoner, som gjør at de elektriske signalene beveger seg raskt og kontrollert i sentralnervesystemet og i det perifere nervesystemet (Petrie, 2007). Figur 1 viser hvordan en normal nervecelle, og en nervecelle med skadet myelin ser ut. Skade på myelinet kan gi en rekke ulike symptomer, som nedsatt føle-evne, synsnervebetennelse, muskelsvakhet eller fatigue (Hernandez et al., 2014). Vevsskadene er forårsaket av immunforsvarets celler, men det er omdiskutert hvorvidt det er immunforsvarets T-celler eller B-celler som spiller den mest sentrale rollen i prosessen. (Dominguez-Villar et al., 2011)(Obermeier et al., 2008). En autoimmun respons kan både være vev- og organspesifikk, og hos MS-pasienter er det sentralnervesystemet som rammes. Prosessen der myelinet ødelegges kalles demyelinisering og fører til arrdannelse i nervevevet. Utover i sykdomsforløpet dannes det flere slike skadede områder, kalt lesjoner, og sykdommen har derfor fått navnet *Multippel sklerose*, som betyr “mange arr”. Når myelinet er skadet, forsinkes signaloverføringer gjennom aksonet og gjør at de ikke videreføres med samme hastighet som tidligere. Både ved tidlige stadier og langtkomne stadier av en MS-sykdom skades også aksonene i tillegg til myelinet. Evnen til å regenerere myelinet er som oftest bedre i tidlige stadier av sykdommen, som til en viss grad kan kompensere for skadene på aksonene (Trapp et al., 1998). Myelinet regenereres ved at oligodendroglia-celler kommer til skadestedet og produserer nye fettstoffer. Dette gjør at signaloverføringen igjen kan forplantes med lik, eller tilnærmet lik, hastighet som tidligere. Ved langtkomne stadier derimot, er evnen til regenerering av myelinet dårligere, slik at de elektriske signalene ikke kan forplante seg på lik linje som tidligere (Hernandez et al., 2014) (Mumenthaler et al., 2004). Årsakene til utvikling og forverring av MS er kun delvis kjente, og det finnes foreløpig ingen “kur” mot sykdommen, derfor er dette en sykdom som det forskes mye på i dag.



Figur 1: Illustrasjon a viser en normal nervecelle med intakt myelin. Nervesignaler beveger seg hurtig gjennom aksonet. Illustrasjon b viser en demyelinisert nervecelle, der signaloverføringen gjennom aksonet er redusert (Illustrasjon: Enciclopedia Catalana/KF-arkiv) (Faiz & Gjerstad, 18/01-22).

1.1.1 Epidemiologi

På verdensbasis er det rundt 2,8 millioner (36 pr 100 000) mennesker som lever med MS, ifølge tall fra 2020 (King, 2020). Det er stor variasjon i forekomst av sykdommen i de ulike delene av verden. Europa og Nord-Amerika er de områdene i verden der flest mennesker har MS. Danmark er ett av de landene med høyest forekomst av MS, da det er beregnet å være 282 personer pr 100 000 som har diagnosen. Det viser seg i tillegg å være en ujevn fordeling mellom kjønnene, da det på verdensbasis er minst dobbelt så mange kvinner som menn med MS. I flere områder av verden er ratioen enda høyere, der det er opptil fire ganger så mange kvinner i forhold til menn med MS. Sykdomsdebut kan skje ved alle aldre, og globalt er gjennomsnittlig alder ved fastsettelse av diagnosen 32 år. Sammenlignet med andre nevrologiske sykdommer, slik som demens og hjerneslag, er dette en relativt ung alder for sykdomsdebut (King, 2020).

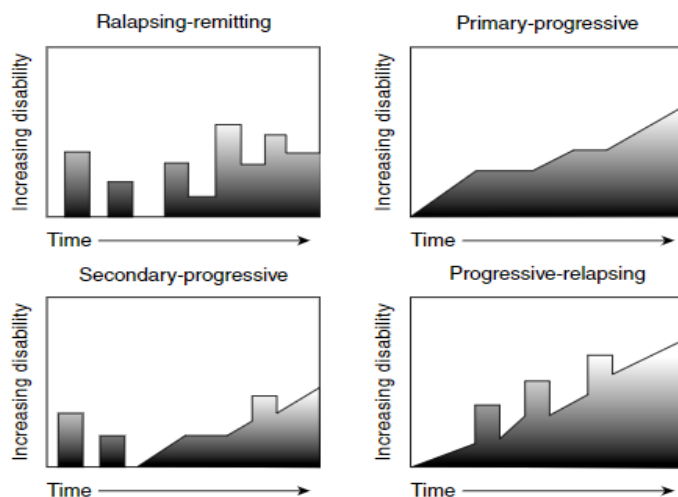
1.1.2 Årsaker til multipel sklerose

Årsaken til den autoimmune responsen som fører til demyelinisering er ikke fullstendig kjent, men en vet at genetiske faktorer spiller en rolle. Studier viser at barn av foreldre med MS har 15-25% større sannsynlighet for å utvikle sykdommen enn andre barn (Dyment et al., 2004). Forskning tyder også på at Epstein Barr viruset (EBV) er en risikofaktor for å utvikle MS, da 99% av pasienter med MS har hatt infeksjon med EBV til sammenligning med 90% av den totale befolkningen (Bagert, 2009). Det er også sannsynlig at ulike miljøfaktorer påvirker utvikling av MS. Basert på geografisk fordeling av MS-pasienter er det gjort studier som viser at blant annet lite eksponering for sollys og lavt nivå av D-vitamin kan ha en betydning for utvikling av sykdommen (Ebers, 2008) (Hernandez et al., 2014).

1.1.3 Inndeling av multipel sklerose

Det er normalt å dele MS inn i fire forskjellige former, avhengig av hvordan sykdomsforløpet den enkelte pasienten har; relapserende remitterende MS (RRMS), sekundær progressiv MS (SPMS), primær progressiv MS (PPMS) og progressiv relapserende MS (PRMS). Figur 2 illustrerer sykdomsforløpet ved de ulike formene. RRMS er den vanligste formen og rammer omtrent 80–85% av MS-pasienter. Vedkommende får perioder med symptomer som kalles for angrep. Disse kan vare i korte eller lengre perioder. I tiden mellom angrepene vil pasienten ha varierende grader av symptomer. Sykdommen vil ikke utvikle seg, og pasientens funksjonsevne holder seg stabil mellom angrepene. Dersom RRMS ikke behandles vil det i 40–50% av tilfellene utvikle seg til SPMS (Rose & Mackay, 2014).

Ved SPMS kan pasienten fortsatt ha perioder med angrep, samtidig som vedkommende konsekvent blir dårligere og dårligere mellom angrepene. Ved PPMS får vedkommende ingen angrep, men blir gradvis dårligere helt fra starten. Det kan være perioder der utviklingen ikke er like drastisk, og sykdommen til tider er stabil. Det kan være vanskelig å oppdage denne formen for MS, og det kan ta måneder eller år før pasienten oppsøker medisinsk behandling (Hauser & Cree, 2020). Denne formen for MS rammer 10–15 % av MS-pasientene. Den siste formen for MS, PRMS, kjennetegnes ved at pasienten gradvis blir dårligere fra sykdomsdebut, samtidig som at de har tidvis angrep. Det er antatt at rundt 5% av MS-pasienter har PRMS (Saunders, 2011) (Rose & Mackay, 2014).



Figur 2: Illustrasjon av funksjonsnedsettelsen som funksjon av tid for de fire ulike formene for MS (fra øverst til venstre); relapserende remitterende MS (RRMS), primær progressive MS (PPMS), sekundær progressiv MS (SPMS) og progressiv – relapserende MS (PRMS) (Saunders, 2011).

1.1.4 Attakker og symptomer

Et angrep vil si en kortere eller lengre periode med symptomer i mer eller mindre alvorlig grad. Under et angrep har pasienten neurologiske symptomer som varer mer enn 48 timer, i fravær av feber. Det skal gå minst 30 dager mellom angrepene for at nyoppståtte symptomer kan defineres som et nytt angrep (Kurtzke, 2014). MS kan komme til uttrykk svært ulikt fra person til person. Ettersom den autoimmune reaksjonen er rettet mot sentralnervesystemet, som igjen påvirker hele kroppen, opplever hver enkelt pasient sykdommen forskjellig. Symptomene er avhengig av hvor i nervesystemet myelinet er brutt ned, enten i hjernen, hjernestammen eller i ryggmargen. Eksempler på symptomer er fatigue, depresjon, kognitive vansker, synsproblemer, smerter, ukontrollert vannlating, forstoppelse, muskelsmerter og seksuell dysfunksjon (Saunders, 2011). Normalt evalueres pasientenes funksjonsevne ved en rekke undersøkelser, og blir tildelt en Expanded Disability status scale score (EDSS-score). Scoren beskriver i hvilken grad pasienten hemmes av sin sykdom, og går i fra nivå 0 til 10. Ved nivå 0 har pasienten normal neurologisk funksjon. Fra nivå 6 og oppover er pasienten avhengig av hjelpemidler for å forflytte seg, og ved nivå 10 er pasienten død som følge av sykdommen (Şen, 2018).

Synsnervebetennelse er et av de vanligste klinisk isolerte syndromer (CIS) for MS-pasienter. Det vil si at pasienten har et symptom, som kan utvikle seg til MS (Miller et al., 2012). Synsnervebetennelse er en tilstand der synsnerven blir demyelinisert, og som oftest er det ett av øynene som blir skadet. Noen dager til uker etter sykdomsdebuten kan pasienten få nedsatt syn, og eventuelt bli midlertidig eller permanent blind på det utsatte øyet (Dalbro & Kerty, 2019). Pasienten kan få smerter i eller bak øyet, og ubehag i forbindelse med bevegelse av øyet (Hansen et al., 2004). Fargesynet kan bli påvirket, og kontraster kan bli mindre tydelige. I 50% av tilfellene vil pasienter med synsnervebetennelse utvikle MS innen 15 år (The Optic Neuritis Study Group, 2008).

1.1.5 Diagnostikk

Ved mistanke om at en person har MS er det ikke ett enkelt klinisk funn, eller én test som kan utføres for å bekrefte eller utelukke sykdommen. Derfor benyttes det et sett med standardiserte kriterier, kalt McDonald-kriteriene (tabell 1), som må oppfylles for å diagnostiseres med MS. Grunnlaget for å stille en MS-diagnose er at sykdomsaktiviteten skal være disseminert, altså spredt, både i tid (DIT) og i lokalisasjon av lesjoner (DIS). DIT vil si at pasienten har hatt mer enn ett angrep ved ulike tidspunkter, og DIS vil si at pasienten har lesjoner i minst 2 typiske områder av hjernen eller ryggmargen. Med tiden har nye undersøkelser blitt en del av diagnostiseringen ved hjelp av McDonald-kriteriene, og da spesielt magnetisk resonans (MR)-undersøkelse og immunologiske undersøkelser av cerebrospinalvæsken (CSF). I noen tilfeller kan MR-undersøkelse eller analyse av CSF være en substitusjon for DIT, noe som gjør at en diagnose kan stilles hurtigere, og behandling kan settes i gang tidligere (Thompson et al., 2018). Ved en aktiv inflammasjon i sentralnervesystemet vil blod-hjerne-barriere-permeabiliteten øke lokalt. Ved MR-undersøkelse med gadoliniumholding kontrastvæske, vil de aktive lesjonene binde til seg kontraststoffet som krysser blod-hjerne-barrieren, mens de inaktive lesjonene ikke bindes. På denne måten kan en påvise sykdomsaktivitet ved flere adskilte tidspunkter, og dermed substituere DIT (Cotton et al., 2003). Undersøkelse av antistoffer i CSF kan være en god tilleggsanalyse, og kan i enkelte tilfeller erstatte DIT. Det utføres elektroforese eller isoelektrisk fokusering av pasientens CSF og blod, og tilstedeværelse av spesifikke monoklonale IgG-antistoffer kun i CSF, og ikke i blodet tyder på syntese av antistoffer i sentralnervesystemet. Disse kalles for oligoklonale bånd (Thompson et al., 2018).

Tabell 1: Oversikt over McDonald kriteriene fra 2017, som må oppfylles for å stille en MS-diagnose. Diagnosen stilles på bakgrunn av påvist disseminert sykdomsaktivitet, både i tid og lokalisasjon av lesjoner i sentralnervesystemet (Thompson et al., 2018) s. 167.

Number of lesions with objective clinical evidence		Additional data needed for a diagnosis of multiple sclerosis
≥2 clinical attacks	≥2	None*
≥2 clinical attacks	1 (as well as clear-cut historical evidence of a previous attack involving a lesion in a distinct anatomical location†)	None*
≥2 clinical attacks	1	Dissemination in space demonstrated by an additional clinical attack implicating a different CNS site or by MRI‡
1 clinical attack	≥2	Dissemination in time demonstrated by an additional clinical attack or by MRI§ OR demonstration of CSF-specific oligoclonal bands¶
1 clinical attack	1	Dissemination in space demonstrated by an additional clinical attack implicating a different CNS site or by MRI‡ AND Dissemination in time demonstrated by an additional clinical attack or by MRI§ OR demonstration of CSF-specific oligoclonal bands¶

If the 2017 McDonald Criteria are fulfilled and there is no better explanation for the clinical presentation, the diagnosis is multiple sclerosis. If multiple sclerosis is suspected by virtue of a clinically isolated syndrome but the 2017 McDonald Criteria are not completely met, the diagnosis is possible multiple sclerosis. If another diagnosis arises during the evaluation that better explains the clinical presentation, the diagnosis is not multiple sclerosis. An attack is defined in panel 1. *No additional tests are required to demonstrate dissemination in space and time. However, unless MRI is not possible, brain MRI should be obtained in all patients in whom the diagnosis of multiple sclerosis is being considered. In addition, spinal cord MRI or CSF examination should be considered in patients with insufficient clinical and MRI evidence supporting multiple sclerosis, with a presentation other than a typical clinically isolated syndrome, or with atypical features. If imaging or other tests (eg, CSF) are undertaken and are negative, caution needs to be taken before making a diagnosis of multiple sclerosis, and alternative diagnoses should be considered. †Clinical diagnosis based on objective clinical findings for two attacks is most secure. Reasonable historical evidence for one past attack, in the absence of documented objective neurological findings, can include historical events with symptoms and evolution characteristic for a previous inflammatory demyelinating attack; at least one attack, however, must be supported by objective findings. In the absence of residual objective evidence, caution is needed. ‡The MRI criteria for dissemination in space are described in panel 5. §The MRI criteria for dissemination in time are described in panel 5. ¶The presence of CSF-specific oligoclonal bands does not demonstrate dissemination in time per se but can substitute for the requirement for demonstration of this measure.

Table: The 2017 McDonald criteria for diagnosis of multiple sclerosis in patients with an attack at onset

1.1.6 Behandling

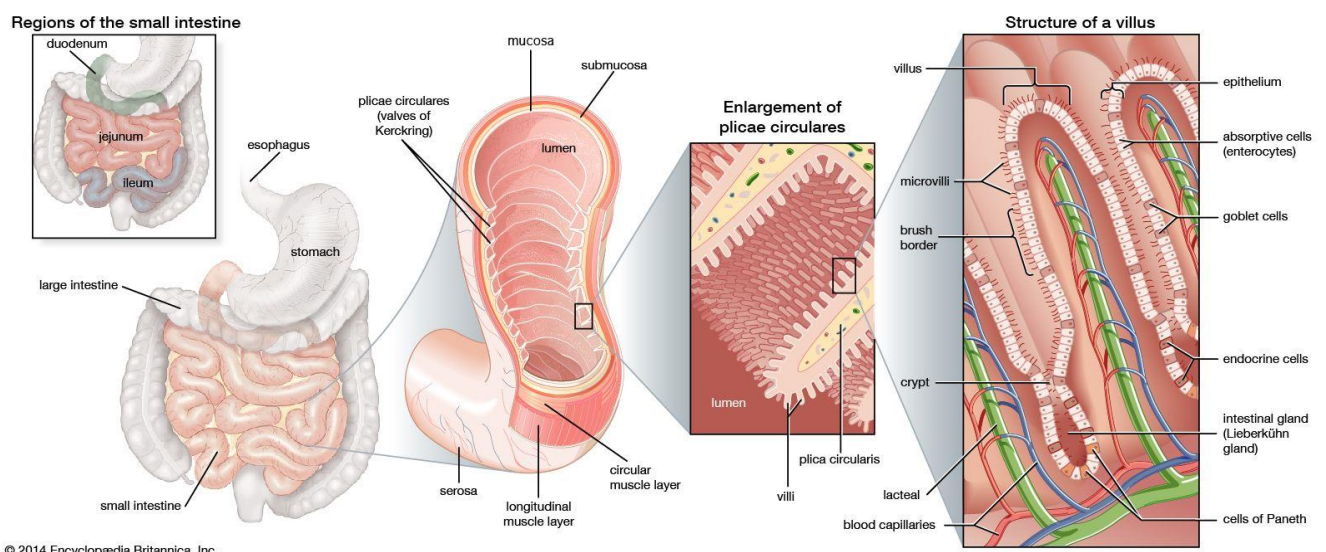
Det finnes ingen behandling som helbreder sykdommen MS, da det er en kronisk sykdom. Det finnes imidlertid medikamenter som kan dempe betennelsesaktiviteten og bremse utviklingen. Det skiller gjerne mellom behandling av symptomene sykdommen gir, og behandling som er ment for å hindre eller forsinke sykdomsutvikling (Rose & Mackay, 2014). Det finnes sykdomsmodifiserende behandling som gis til MS-pasienter, og de fleste av disse har anti-inflammatorisk effekt, altså at de påvirker ulike komponenter i immunsystemet og undertrykker deres effekt (Myhr, 2008). Jo mer immunforsvarets celler skader nervecellene, desto mer utvikler sykdommen seg. Immunoterapi viser seg stort sett å fungere godt for pasienter med attackvis MS, men mindre effektivt hos pasienter med primær- og sekundær-progressiv MS (Rose & Mackay, 2014). Per dags dato er det standard i Danmark å gi immunmodulerende medikamenter som “førstelinje” behandling. Dersom dette ikke fungerer for pasienten blir “andrelinje” behandling gitt, som blant annet monoklonale antistoffer (Fagudvalget for multipel sklerose, 2016). Andrelinjebehandling har som regel kraftigere effekt, men medikamentene er vanligvis mer toksiske for pasienten (Río et al., 2011). For de fleste pasienter er behandling for å håndtere symptomene viktig for å leve et så normalt liv

som mulig. Nye og bedre behandlingsformer for MS er stadig under utprøving og utvikling, deriblant stamcellebehandling. Det er også økende interesse rundt ideen om at endret kosthold kan ha en modifierende effekt på sykdommen, og en glutenfri kost er en av diettene som forskes på (Thomsen et al., 2019).

1.2 Tarmens permeabilitet og autoimmune sykdommer

1.2.1 Tarmens oppbygning og permeabilitet

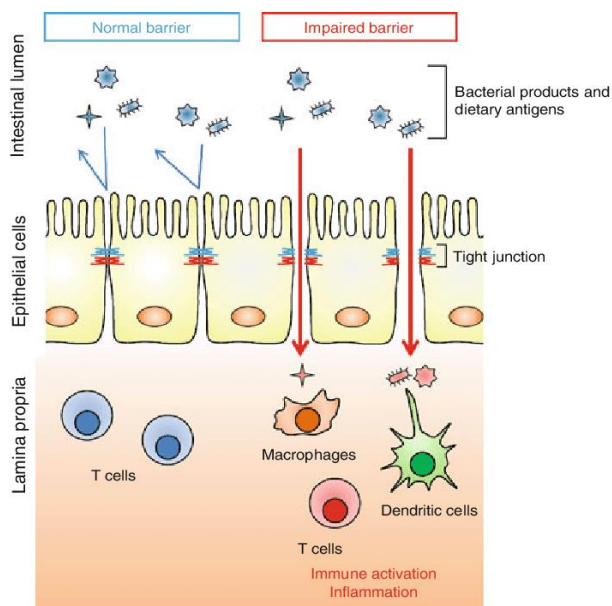
Tynntarmen er en viktig del av fordøyelseskanalen, og ligger plassert mellom magesekken og tykktarmen. Figur 3 illustrerer plassering og oppbygning av tynntarmen. Den har en stor overflate inn mot lumen grunnet dens foldede oppbygning, krypter, villi og mikrovilli. Den indre overflaten av tynntarmen, som er i kontakt med innholdet i lumen, er bygget opp av epitelceller. Disse er blant annet med på å regulere absorpsjon av næringsstoffer over tarmveggen. Epitelcellene fungerer også som en barriere mot ukjente antigener i tarminnholdet i lumen (Hansen et al., 2004).



© 2014 Encyclopædia Britannica, Inc.

Figur 3: Illustrasjon av tynntarmen. Tynntarmen ligger plassert mellom magesekken og tykktarmen (andre illustrasjon f.v). På fjerde illustrasjonen f.v. kan en se folder, krypter og villi. Illustrasjonen lengst til høyre viser nærbilde av krypter og villi med mikrovilli i tynntarmen. Her kan en se epitelceller som regulerer absorpsjon av næringsstoffer i tarmlumen (Encyclopædia Britannica, Inc., 2020).

Molekyler absorberes over tarmbarrieren på to ulike måter; transcellulært og paracellulær. Ved transcellulær transport fraktes molekyler gjennom cellen, og ved paracellulær transport fraktes molekylene mellom cellene (Misra, 2010). For å hindre at molekyler flyter uregulert mellom cellene, står cellene i kontakt med hverandre ved hjelp av “Tight Junctions” (TJ), kalt tette cellefobindelser på norsk. Slik figur 4 viser, tillater TJ at nødvendige molekyler som vann og næringsstoffer transporteres over tarmveggen, mens større antigener, lipider og peptider fra mikrober og ufordøyde komponenter fra kosten, normalt sett forhindres fra å krysse tarmbarrieren (Berkes, 2003). TJ er bundet til aktin, som forankrer TJ til cytoskjelettet. Ytre stimuli påvirker kontraksjonen av aktin, og regulerer på denne måten permeabiliteten mellom cellene. Regulering av TJ er dermed en viktig mekanisme for å holde tarmen robust, og for å opprettholde en barriere mot at uønskede molekyler krysser tarmveggen (Kiesslich et al., 2007). Dersom et antigen passerer tarmveggen, vil tarmens immunforsvar aktiveres og skape en immunologisk respons. Dette fører til utskillelse av molekyler som kan gjøre skade på TJ, og immunresponsen forsterkes ytterligere. Dysfunksjonelle TJ, som resulterer i økt tarmpermeabilitet, er kjent å være forbundet med en rekke autoimmune sykdommer som cøliaki, Crohns sykdom, ulcerøs kolitt (Lerner & Matthias, 2015).



Figur 4: Hvordan tarmens immunforsvar reagerer når Tight Junctions (TJ) er intakte (t.v), kontra når TJ er dysregulert, slik at antigener kan krysse tarmveggen (t.h) (Suzuki, 2013).

1.2.2 Tarmens påvirkning på multippel sklerose

Som forklart tidligere vil dysfunksjonell regulering av tarmens permeabilitet kunne gi økt immunrespons. Av den grunn stilles det spørsmål rundt hvorvidt økt tarmpermeabilitet har en sammenheng med utvikling av andre autoimmune sykdommer, som MS. En studie basert på 22 MS-pasienter og 18 friske kontrollpersoner viser at økt tarmpermeabilitet var signifikant hyppigere hos personene med MS enn hos kontrollpersonene; 73% av MS-pasientene hadde økt tarmpermeabilitet, versus 28% av de friske ($p = 0,001$). Tarmpermeabiliteten ble målt vha. en sukkerabsorpsjonstest med lactulose og mannitol, hvor økt tarmpermeabilitet ble definert ved en lactulose/mannitol-ratio (L/M-ratio) over 0,03. I tillegg viser studien at pasientene hadde signifikant dårligere opptak av mannitol enn de friske kontrollpersonene ($p = 0,022$), noe som indikerer malabsorpsjon av næringsstoffer i tynntarmen hos pasientene (Buscarinu et al., 2017). Videre viser en modellstudie på mus utført av Braniste et al. at tarmfloraen har sammenheng med permeabiliteten i blod-hjernebarrieren. Studien fant at mus med bakteriefri tarm har økt permeabilitet i blod-hjernebarrieren i forhold til mus med normal tarmflora ($p < 0,001$) (Braniste et al., 2014). En annen studie gjort av Horai et al. undersøker hvorvidt immunceller som reagerer på kroppsegne strukturer kan ha blitt aktivert i tarmen. Studien baserer seg på undersøkelser av mus med en autoimmun betennelse på øyet, kalt uveitt. Det ble funnet at T-celler som har krysset blod-netthinne-barrieren og skapt denne betennelsen på øyet, trolig har mottatt aktiveringssignaler fra antigener i tarmens mikrobiom (Horai et al., 2015). Disse funnene understreker hvor viktig tarmens mikrobiom og permeabilitet trolig er for utvikling av enkelte sykdommer, og at dette er nødvendig å forske videre på for å få økt kunnskap om sykdomsutvikling og behandling av MS.

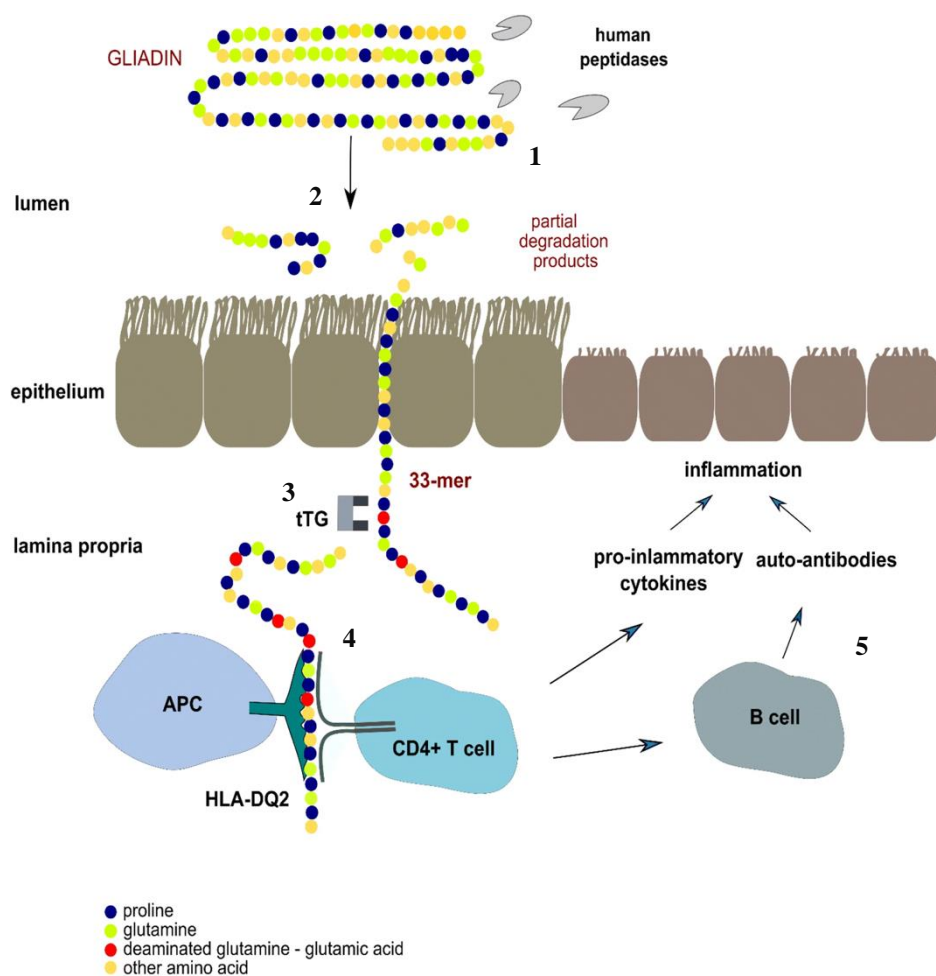
1.2.3 Tidligere forskning; gluten og tarmpermeabilitet

Tarmens epitel utgjør den største slimhinnen i menneskekroppen, og er et «møtested» mellom komponenter fra det ytre miljøet og kroppens indre (Visser et al., 2009). Derfor er det meget viktig at opptak av stoffer fra tarmlumen er nøye regulert, og det forskes stadig på hvordan disse mekanismene fungerer, og hvordan reguleringen av dem henger sammen med ulike sykdomsmekanismer. En gruppe proteiner som får mye oppmerksomhet i media og i forskningsmiljøer verden over, er gluten. Det er gjort mye forskning på glutens påvirkning på

tarmpermeabilitet, samt sammenhengen mellom gluten og autoimmune sykdommer som cøliaki og type 1 diabetes mellitus.

Gluten er en gruppe proteiner som finnes i kornsortene hvete, rug og bygg. Ved bearbeiding kan proteinene danne elastiske nettverk, og denne egenskapen utnyttes i stor grad i moderne matproduksjon. Glutenproteinene kan deles inn i to grupper, basert på deres løselighet i en 60% etanol-løsning; prolaminer og gluteniner. Gliadiner er navnet på prolaminet som finnes i hvete (Wieser, 2007). Hos mennesker blir proteiner normalt brutt ned til aminosyrer, di- og tripeptider av enzymer i mage- og tarmkanalen. Gliadiner blir derimot ikke fullstendig brutt ned av fordøyelsesenzymer, da de blant annet inneholder sykliske strukturer som inhiberer enzymene fra å spalte bindingene mellom noen av aminosyrene. En rekke oligopeptider vil derfor bli værende i tynntarmen. Dersom det er patologisk økning i tarmpermeabiliteten, vil oligopeptidene lettere passere epitelbarrieren paracellulært. I bindevevet under epitelet kan oligopeptidene aktivere en autoimmun reaksjon hos genetisk predisponerte pasienter (Scherf et al., 2016).

Når gliadinet passerer epitelbarrieren blir det deaminert av et enzym som heter tissue-transglutaminase (tTG). Hos personer med cøliaki blir omgjøringsproduktene gjenkjent av antigenpresenterende celler, og presentert på major histocompatibility complex II (MHC II), slik figur 5 illustrerer (Molberg et al., 1998). T-hjelpeceller registrerer MHC II-gliadin-komplekset og frigjør inflammatoriske cytokiner. Samtidig frigjøres natural killer cells, og autoantistoffer mot gliadin og tTG dannes (Lebwohl et al., 2018). Det oppstår dermed langvarig inflammasjon i tynntarmen, som over tid vil ødelegge villi og føre til malabsorpsjon av næringsstoffer (Scherf et al., 2016). Det er stor variasjon i alvorlighetsgrad av symptomer blant cøliaki-pasienter. Enkelte pasienter får ingen eller milde symptomer, mens andre pasienter får alvorlige symptomer. Eksempler på symptomer er diaré, forstoppelse og magesmerter. I tillegg kan en få blant annet anemi og beinskjørhet, grunnet mangelfull absorpsjon av næringsstoffer fra kosten.



Figur 5: Gliadin brytes delvis ned av fordøyelsesenzymer (1), og nedbrytningsproduktene transporteres paracellulært ved økt permeabilitet i tarmen (2). Nedbrytningsproduktene deamineres av tissue-transglutaminase (tTG) i bindevevet (3). Omgjøringsproduktene gjenkjennes av antigenpresenterende celler (APC) hos personer med cøliaki, og presenteres på MHC II (4). T-celler gjenkjenner MHC II-gliadin-komplekset og aktiverer en inflammasjon som skader tynntarmepitelet (5) (Kõiv & Tenson, 2021).

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) er en autoimmun sykdom som, i likhet med MS, påvirkes av både genetikk og miljøfaktorer (Delli & Lernmark, 2014). Sykdommen karakteriseres ved en kronisk autoimmun respons mot betacellene i bukspyttkjertelen. Dette fører til delvis eller fullstendig hemmet insulinproduksjon, og glukosenivået i blodet stiger. Det har blitt påvist en sammenheng mellom cøliaki og T1DM, og prevalens av cøliaki er høyere hos pasienter med T1DM enn den generelle befolkningen (Cronin et al., 1997) (Sategna-Guidetti et al., 1994). I et forsøk gjort av Funda, D. P. et al. ble det undersøkt om det er en sammenheng mellom en glutenholdig diett og utvikling av T1DM. 56 normalvektige hunn-mus som er predisponert for utvikling av T1DM ble fordelt i to grupper, der intervensjonsgruppen ble fôret med en

glutenfri (GF) diett og kontrollgruppen ble føret med en tilsvarende glutenholdig diett. Det ble funnet at hos mus som fulgte GF diett, var insidensen av T1DM signifikant lavere enn hos mus som gikk på diett som inneholdt gluten ($p=0,00007$) (Funda et al., 1999). Disse resultatene gir grunnlag for at en glutenfri diett kan forhindre eller forsinke utviklingen av T1DM. Det er derfor interessant å forske på om gluten også kan påvirke andre autoimmune sykdommer, som for eksempel MS.

De nevnte artiklene er kun et fåtall av forskningsprosjekter som tyder på at gliadin påvirker menneskekroppen på måter vi tidligere ikke har kjent til. Det forskes i dag blant annet på hvorvidt gliadineksponering kan øke permeabiliteten i tarmen hos mennesker. I en studie av Clemente et al. ble epitelceller fra rotte-tarm inkubert med en gliadin-holdig løsning. Det ble funnet at gliadin var et meget kraftfullt agens for å øke utskillelsen av et stoff kalt zonulin fra cellene (Clemente et al., 2003). Zonulin er et protein som, ved binding til epitelcellene, induserer nedbrytning av TJ mellom cellene. Dette øker den paracellulære permeabiliteten, og dermed også transporten av molekyler, inkludert gliadin, over tarmveggen. Liknende resultater er også funnet hos mennesker i en studie gjort av Hollon et al. Her ble biopsier fra både pasienter med kjent glutensensitivitet og fra kontrollpersoner uten glutensensitivitet, inkubert med medium både med og uten gliadin. De fant at biopsier fra kontrollpersoner uten glutensensitivitet inkubert med gliadin i 30, 60 og 120 minutter hadde økt tarmpermeabilitet sammenlignet med biopsier som ikke var eksponert for gliadin ($p= 0,008, 0,03, 0,008$, henholdsvis) (Hollon et al., 2015). Dette viser at gliadin gir økt utskillelse av zonulin også hos mennesker, som fører til økt tarmpermeabilitet. Det er fortsatt usikkerhet rundt konsekvensene av endringer i TJ, men, som forklart tidligere, blir stadig flere autoimmune sykdommers patogenese knyttet opp mot dysfunksjon i TJ i tarmen. Det diskuteres hvorvidt oppregulering av zonulin-eksresjon kan bidra i utvikling og forverring av sykdommer der det er en feil med intercellulær kommunikasjon, slik som cøliaki og T1DM (Fasano, 2001).

Multipel sklerose er, som nevnt tidligere, en sykdom hvor det har blitt påvist en relativ økning i tarmpermeabilitet sammenlignet med friske individer. Det er derfor relevant å undersøke om økt tarmpermeabilitet kan øke risikoen for MS eller lede til et mer aggressivt sykdomsforløp, og om GF diett påvirker dette. Ved universitetssykehuset i Asturias ble det gjennomført en klinisk studie med 72 pasienter, hvor det ble sammenlignet effekten av en GF diett mot en glutenholdig diett hos pasienter med RRMS. Det ble rapportert at GF diett hadde nevro-beskyttende effekt på pasientene. Pasientene som hadde gått på GF diett hadde gjennomsnittlig bedre EDSS-score og mindre lesjoner, enn pasientene som gikk på

glutenholdig diett (Rodrigo et al., 2014). Videre har MS-forskningsgruppen ved Rigshospitalet Glostrup gjennomført et systematisk litteratursøk for å undersøke kunnskapen som finnes i litteraturen om sammenhengen mellom MS og glutenproteiner. 49 publikasjoner inngikk i litteratursøket, og det ble funnet to intervensjonsstudier, samt én prospektiv kohortstudie som tyder på at en GF diett har en positiv effekt på MS-sykdom. I flesteparten av publikasjonene som ble undersøkt var det ikke mulig å konkludere om gluten bedret, forverret eller i noen grad påvirket sykdommen. Litteratursøket viser imidlertid at det bør forskes ytterligere på dette emnet, for å få full forståelse av hvordan glutenproteinet påvirker MS-pasienter (Thomsen et al., 2019).

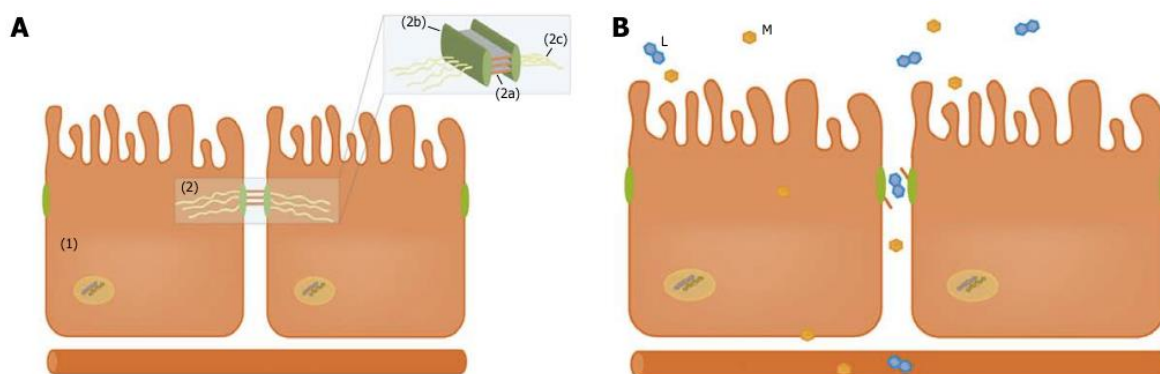
1.3 Måling av tarmpermeabilitet

1.3.1 Måling av tarmpermeabilitet ved bruk av sukkertest

Ettersom tarmpermeabiliteten har vist seg å være relevant ved utviklingen av enkelte autoimmune sykdommer, har det blitt utviklet flere metoder for å måle dette. Måling av tarmens evne til å oppta bestemte sukkerarter viser seg å være en god indikator på tarmens permeabilitet og absorpsjonsevne. Sukkertesten baserer seg på hypotesen om at store molekyler som er inntatt oralt, ikke krysser tarmveggen med mindre tarmveggens regulering dysfunksjonell, slik at permeabiliteten øker. Ved økt tarmpermeabilitet vil molekyler, som enkelte sukkerarter, krysse tarmveggen, diffundere over i blodbanen og til slutt skilles ut i urinen hvor de kan detekteres. En studie gjort på 1970-tallet viser at store oligosakkarider, som lactulose, i liten grad absorberes gjennom tarmveggen hos friske personer, mens hos pasienter med økt tarmpermeabilitet absorberes oligosakkaridet paracellulært over i blodbanen i større grad. Denne sukkertesten er begrenset til tynntarmen da det er her lactulose absorberes (Menzies et al., 1979). For å korrigere for biologiske variasjoner mellom personer, som magetømmingshastighet, lengden på tynntarmen, bakteriell nedbrytning, metabolisering i leveren, nyrefunksjon og diurese, har det blitt utviklet metoder der en inkluderer et monosakkarid, som mannitol. Monosakkarider er mindre i størrelse og diffunderer både transcellulært og paracellulært over tarmveggen i tynntarmen, uavhengig av personens tarmpermeabilitet. Figur 6B illustrerer hvordan lactulose og mannitol beveger seg over tarmveggen (Grootjans et al., 2010). Ratioen av utskilt lactulose og mannitol målt i urin, kan derfor gi et mer korrekt bilde av tarmpermeabiliteten og den paracellulære absorpsjonen, enn

lactulose alene. Høy L/M-ratio er et tegn på økt tarmpermeabilitet, da dette tyder på at mye lactulose transporteres over i blodet.

Xylose er også et monosakkarid som benyttes for å måle tarmens funksjon, og med denne sukkertesten er det tynntarmen absorpsjonsevne som måles. Dette sukkeret metaboliseres ikke hos mennesker, og skilles derfor ut i urinen uforandret. Normalt vil xylose lett absorberes i tynntarmen, men ved dysfunksjonell tarm vil en etter inntak av sukkeret kunne detektere lavere verdier enn forventet i urinen. Xylose-testen utføres altså for å undersøke om tynntarmen tar opp næringsstoffer slik den skal (Helmer & Fouts, 1930) (Hurley, 1995).



Figur 6: Komponenter fra tarmlumen transporteres til sirkulasjonssystemet ved økt permeabilitet i tarmen. A: tarmepitelets enterocytter (1) er koplest tett sammen med Tight junctions (2) for å hindre at uønskede komponenter beveger seg fra tarmen og over i sirkulasjonssystemet. B: Disakkaridet lactulose (L) transporteres kun paracellulært over tarmepitelet dersom tarmen har økt permeabilitet. Monosakkaridet mannitol (M) kan krysse tarmepitelet både transcellulært og paracellulært, og er derfor en korreksjon for biologiske variasjoner (Grootjans et al., 2010).

1.3.2 High Performance Anion Exchange Chromatography med Pulsed Amperometric Detection

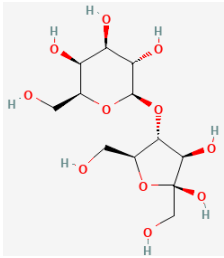
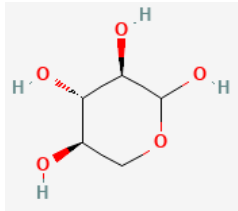
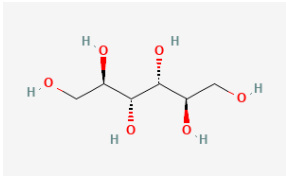
Metoden som benyttes for deteksjon av karbohydrater i urin er High Performance Anion Exchange Chromatography, med Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD).

Kromatografi baserer seg på at komponenter i en løsning blir separert på bakgrunn av deres kjemiske eller fysiske egenskaper, slik som størrelse, ladning og løselighet. De vanligste kromatografi-metodene er væske-, gass- og ionebytterkromatografi. Prøven blandes med en mobil fase og føres gjennom en stasjonær fase, som vanligvis er en kolonne. På bakgrunn av deres fysiske og kjemiske egenskaper beveger komponentene seg gjennom den stasjonære fasen i ulik hastighet. Tiden det tar fra en analytt injiseres i kolonnen, til den treffer detektoren

kalles for retensjonstiden. På bakgrunn av ulik retensjonstid for ulike molekyler er det mulig å skille mellom de ulike komponentene som prøven inneholder (Weiss, 2020).

HPAE-PAD er en anionbyttermetode, der komponentene separeres på bakgrunn av ladning. Kolonnematerialet er positivt ladet, og komponentene i den mobile fasen er negativt ladet. Bufferløsningen, som i dette tilfelle er natriumhydroksid (NaOH), blir sendt gjennom kolonnen og hydroksidgruppene (OH⁻) binder seg til positive partikler i kolonneveggen. Deretter injiseres pasientprøven. Karbohydrater er svake syrer med en pKa-verdi mellom 12 og 14 (Corradini et al., 2012). pKa-verdien til karbohydratene sier noe om hvor lett det dissosierer. Ved høy pH vil OH-gruppen i karbohydratringen miste ett eller flere hydrogenatom og O⁻ vil stå igjen. Når de ioniserte karbohydratene injiseres i kolonnen, vil de bytte plass med OH-gruppene som allerede er bundet til partiklene i kolonneveggen (Weiss, 2020). Desto lavere pKa-verdi et karbohydrat har, desto sterkere binder det seg til kolonnen (Rohrer, 2021). En kan dermed lage en forventning til rekkefølgen karbohydratene vil elueres ut av kolonnen, basert på deres pKa-verdier. Tabell 2 viser en oversikt over pKa-verdien til karbohydratene benyttet i sukkertesten (*DL-Xylose*, 2022) (*Lactulose*, u.å.) (*Mannitol*, 2022). På bakgrunn av pKa-verdiene forventes det at mannitol har lavest retensjonstid, deretter xylose, og til slutt lactulose.

Tabell 2: Oversikt over pKa-verdiene for karbohydratene benyttet i sukkertesten, samt deres strukturformel (DL-Xylose, 2022) (Lactulose, u.å.) (Mannitol, 2022). Lactulose har lavest pKa-verdi og er derfor den sterkeste syren, og binder seg sterkere til kolonnematerialet enn de to andre karbohydratene.

Karbohydrat	pKa-verdi	Strukturformel
Lactulose	11,7	
Xylose	12,14	
Mannitol	13,50	

Instrumentet benytter Pulsed Amperometric Detection (PAD) som er en elektrokjemisk deteksjonsmetode. Metoden baserer seg på amperometrisk deteksjon, hvor det dannes en strøm når OH-gruppene fra karbohydratene oksiderer på overflaten av en gullelektrode. Denne strømmen detekteres, og strømstyrken er proporsjonal med konsentrasjon av komponentene innenfor et gitt måleområde. Signalet blir presentert som en kromatografisk topp i kromatogrammet (Weiss, 2020).

1.3.3 Avlesning fra kromatogram

Et kromatogram er en grafisk fremstilling av en kromatografisk analyse, som viser deteksjonen av ulike komponenter i en prøve. Hver komponent i prøven danner ideelt sett hver sin topp i kromatogrammet. Høyden på toppen langs y-aksen er avhengig av mengden strøm som dannes i detektoren, som igjen er avhengig av blant annet mengde analytt i prøven. Hvor toppen befinner seg langs x-aksen avhenger av hvor lang tid komponenten bruker gjennom kolonnen (retensjonstid, t_R). For å kunne separere to komponenter er det nødvendig at toppene har ulik retensjonstid. Hvis komponentene har samme retensjonstid, vil toppene havne på samme sted i kromatogrammet. Formen på toppene er også viktig for å kunne garantere god resolusjon (R_S) og deteksjon. Resolusjon er et kvantitativt mål på hvor godt to topper er separert fra hverandre i et kromatogram. Dette er definert som forskjellen i retensjonstid mellom to topper multiplisert med 2, dividert på deres sammenlagte bredde (W) (formel 1). Det er ufullstendig separasjon av to topper dersom R_S beregnes til lavere enn 0,8, mens god separasjon er oppnådd dersom R_S beregnes til 1,25 eller høyere (Burtis et al., 2008b).

$$\text{Resolusjon } (R_S) = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_B + W_A} \quad (1)$$

Beregning av resolusjonen er et nyttig hjelpemiddel for å vurdere om noen av de analytiske forholdene bør endres på for å bedre separasjonen mellom komponentene i prøven. Det er ulike betingelser som kan justeres på, slik at resolusjonen blir best mulig. Betingelsene for den mobile fasen kan enten være isokratisk eller gradert. Ved isokratiske forhold holdes betingelsene konstant gjennom hele analysen, mens ved gradient vil betingelsene endres underveis. I denne oppgaven er det valgt å fokusere på betingelsene flow-hastighet, NaOH-konsentrasjon og temperatur i den mobile fasen.

Det er også ønskelig at toppene er symmetriske. En asymmetrisk topp karakteriseres ved at avstanden fra starten av toppen til midten, og fra midten til enden av toppen er forskjellig. Det er to former for asymmetri; «fronting» og «tailing». «Fronting» oppstår ved tilfeller der den fremste halvdel av toppen er bredere enn den bakre delen. Ved «tailing» er tilfellet motsatt. Asymmetri er et tegn på at noe ved metoden eller instrumentet ikke er optimalt, slik at analytten elueres ut av kolonnen over et lenger tidsrom. Asymmetri kan i tillegg gi bredere

topper, som heller ikke er ønskelig. Bredden på en topp (båndspredningen) er avhengig av tiden analytten bruker på å bli fullstendig eluert ut av kolonnen. Båndspredningen må minimeres slik at ikke toppen fra analyttene overlapper hverandre. Ved økt bredde vil toppen bli lavere, og det er derfor ideelt at toppene er høye med lav båndspredning (Burtis et al., 2008a)(Harvey, 2000).

1.3.4 Forskjeller mellom PA20-kolonnen og MA1-kolonnen

Ved deteksjon av mannitol, xylose og lactulose i urin med HPAE-PAD, er Dionex CarboPac PA20-kolonnen og Dionex CarboPac MA1-kolonnen aktuelle. Disse kolonnene er begge utviklet for å separere karbohydrater, men på noen områder er de forskjellige.

Kolonnematerialet i PA20-kolonnen består av latekspartikler bundet til anion-byttergruppene, mens MA1-kolonnen har anion-bytter gruppene direkte på partikkeloverflaten. PA20-kolonnen er egnet for separasjon av sammensatte monosakkarider. Denne kolonnen har en diameter på 3 mm og en lengde på 150 mm. Kolonnematerialet har en partikkelstørrelse på 6µm. Ionebytter-kapasiteten er på 65 µeq per kolonne. Dette er et mål på hvor mange anioner som binder seg til kolonnen (*Ion Exchange Chromatography*, u.å.). Systemet kan tåle et maksimalt trykk på 3500 psi. MA1-kolonnen er egnet for separasjon av svakt ioniserte komponenter som sukkeralkoholer, spesielt mono- og disakkaridalkoholer. Denne kolonnen har en noe større diameter og lengde på henholdsvis 4mm og 250 mm. Kolonnematerialet har en partikkelstørrelse på 7,5 µm. Her er ionebytter-kapasiteten på 1450 µeq, som vil si at det er flere anioner som kan binde seg til kolonnematerialet i MA1-kolonnen enn i PA20-kolonnen. Systemet tåler imidlertid et lavere maksimalt trykk enn PA20-kolonnen, da den kun tåler et trykk opp til 2000 psi. En oversikt over forskjellene mellom de to kolonnene er gitt i tabell 3 (Thermo Scientific, 2018)(Thermo Scientific, 2013).

Tabell 3: Oversikt over forskjellene mellom PA20- og MA1-kolonnene, som gjør dem egnet til analyser av ulike komponenter. PA20-kolonnen er godt egnet til å separere sammensatte monosakkarider, mens MA1-kolonnen er egnet til separasjon av mono- og disakkaridalkoholer. PA20-kolonnen tåler et høyere trykk enn MA1-kolonnen, men har imidlertid lavere partikkelstørrelse i kolonnematerialet og lavere ionebytterkapasitet enn MA1-kolonnen.

	PA20-kolonne	MA1-kolonne
Seperasjon av	Sammensatte monosakkarider	Sukkeralkoholer av mono- og disakkarider
Kolonnestørrelse	Diameter: 3 mm Lengde: 150 mm	Diameter: 4 mm Lengde: 250 mm
Kolonnematerialets partikkelstørrelse	6 µm	7,5 µm
Ionebytter-kapasitet	65 µeq	1450 µeq
Maksimalt trykk	3500 psi	2000 psi

1.4 Hensikt med oppgaven

Denne oppgaven er en del av arbeidet knyttet til Lina Moschoula Passali sin doktorgrad innen klinisk ernæring, der hovedhensikten er å undersøke om glutenfri diett kan påvirke tarmpermeabiliteten hos pasienter med tidlige stadier av MS-sykdom. Vår oppgave i dette prosjektet er å optimalisere en metode med HPAE-PAD for å detektere mannitol, lactulose og xylose i urinprøver. Hovedfokuset er å definere optimale betingelser for sikker deteksjon av sukkerartene. Metodene som etableres med HPAE-PAD skal videre brukes til å analysere urinprøver fra pasienter som har gått på glutenfri diett (intervensjonsgruppe) i 6 måneder og en kontrollgruppe med som har fortsatt med sin vanlige diett, og vurdere om det er signifikant forskjell i tarmpermeabilitet mellom gruppene. Ut ifra spørreskjemaer pasientene har svart på, skal det lages en oversikt over karakteristika for deltakerne i forskningsprosjektet. Det skal i tillegg utvikles en metode for beregning av gluteninntaket til pasientene i løpet av prosjektperioden, kalt en glutenscore. Glutenscoren skal brukes for å kontrollere om intervensjonsgruppen faktisk har spist glutenfritt, samt gi en oversikt over hvor mye gluten deltakerne i kontrollgruppen har spist.

2.0 Materiale og metode

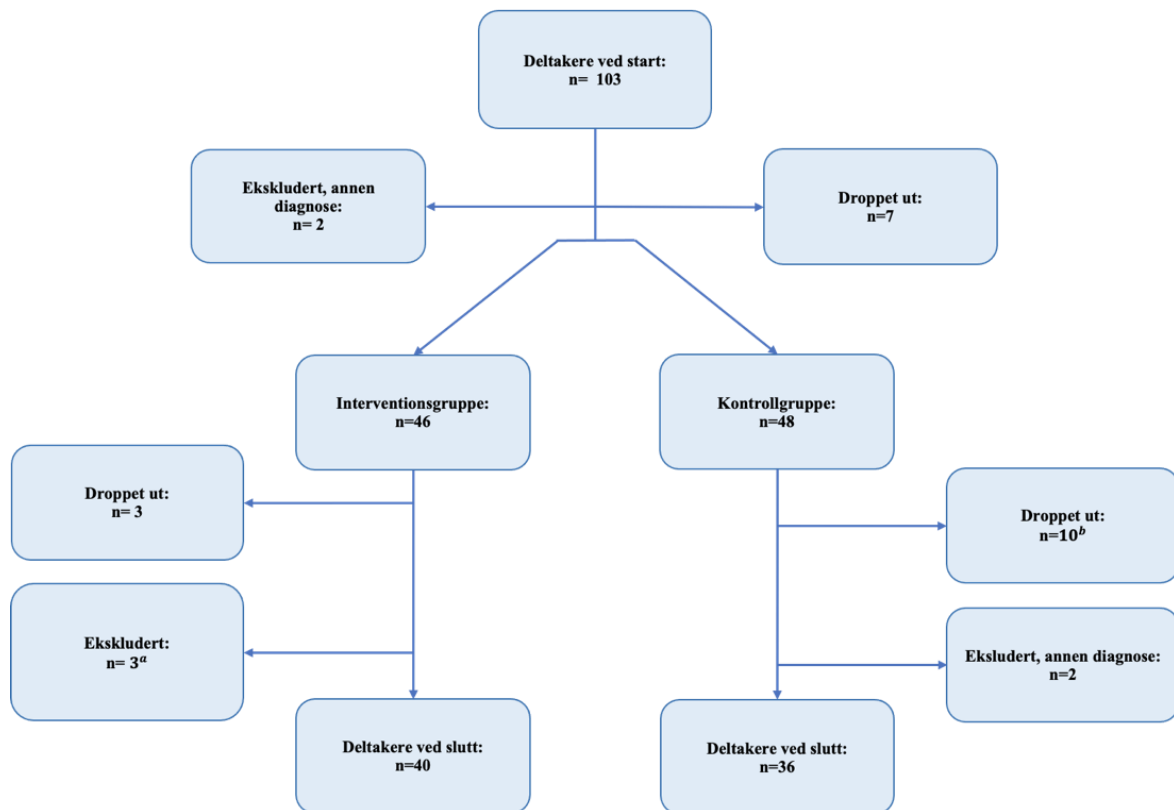
2.1 Gjennomføring av forskningsprosjektet og rekruttering av deltakere

Dette bachelorprosjektet gjennomføres som en del av et større forskningsprosjekt som pågår ved Neurologisk afdeling, Rigshospitalet Glostrup. Forskningsprosjektet er godkjent av Videnskabsetisk Komité B for Region Hovedstaden (Journal_nr.: H-17019986). Pasienter som ble henvist til skleroseklinikken ved Rigshospitalet Glostrup med klinisk isolert syndrom (CIS), fra 2018 til 2021, ble invitert til å delta i en kontrollert intervensjonsstudie. Pasientene fikk utlevert informasjon om forskningsprosjektet og fikk vite at intervensjonsgruppen skulle følge en glutenfri diett i seks måneder, mens kontrollgruppen skulle holde seg til sin vanlige diett. Denne rekrutteringen ble gjennomført av overlege Jette Frederiksen ved Skleroseklinikken ved Rigshospitalet Glostrup. Kvinner og menn i alderen 18 til 59 år ble rekruttert, forutsatt at de var i fysisk og mental stand til å gjennomføre prosjektet. Fra januar til april 2018 ble det kun rekruttert pasienter med synsnervebetennelse, før pasienter med alle former for CIS ble rekruttert. Dersom en pasients symptomer senere skulle vise seg å være relatert til en annen sykdom enn MS, ble denne pasienten ekskludert fra studien. Pasienten kunne heller ikke ha en eller flere av en rekke eksklusjonskriterier, som blant annet graviditet, konkurrerende komorbiditet, eller at de allerede gikk på en glutenfri diett. Ved «baseline» (start) og «follow-up» (FU, avslutning) av forsøksperioden ble det gjennomført blodprøvetaking, spinalpunksjon, MR-skanning, antropometriske målinger (høyde, vekt, midjeomkrets) og sukkertest, i tillegg til at pasientene svarte på en rekke spørreskjemaer. Til gjennomføring av vårt prosjekt ble det disponert urinprøver fra sukkertesten og rådata fra antropometriske målinger og spørreskjemaer.

2.1.1 Oversikt over deltakere i prosjektet

Flytskjema i figur 7 visualiserer deltakerne i forskningsprosjektet, og viser i tillegg antall som droppet ut eller ble ekskludert underveis. Det var 103 pasienter som skrev under på samtykkeerklæring ved start av prosjektet. 48 pasienter valgte å delta i kontrollgruppen, og 46 valgte å delta i intervensjonsgruppen. Til sammen ble 7 pasienter ekskludert, og 20 pasienter droppet ut i løpet av forskningsprosjektets periode. 40 pasienter fra intervensjonsgruppen, og

36 pasienter fra kontrollgruppen fullførte forskningsprosjektet, som til sammen er 76 pasienter.



Figur 7: Flytskjemaet viser fordelingen av deltakere i intervensjonsgruppen og kontrollgruppen, samt hvor mange som droppet ut eller ble ekskludert underveis i prosjektet.

a: I intervensjonsgruppen ble én pasient ekskludert grunnet graviditet, og to ekskludert grunnet annen diagnose.

b: I kontrollgruppen var det to pasienter som droppet ut grunnet restriksjoner under corona-pandemien, én grunnet sykdom og de resterende av andre personlige årsaker.

2.2 Gjennomføring av sukkertest

Pasientene gjennomførte sukkertest ved Skleroseklinikken på Rigshospitalet Glostrup. Dagen før pasientene skulle gjennomføre testen ble de bedt om å unngå følgende; hard trening, melk og melkeprodukter, frukt, honning, lakris, tørket frukt, alkohol, sterk mat, koffein, sukkerfritt godteri og tyggegummi, avføringsmidler, samt medisiner av typen non-steroid antiinflammatoriske midler (NSAID). I tillegg ble pasientene bedt om å faste fra kl. 22.00 dagen før sukkertesten. Dette ble gjort for å sikre at deteksjonen av lactulose, mannitol og xylose i urinen kun stammet fra sukkerløsningen. Da pasientene ankom sykehuset ble de bedt om å tømme innholdet i urinblæren i en beholder. Denne urinprøven ble kalt start-urin. Videre

inntok pasientene en sukkeroppløsning med 20 g xylose (Sigma-Aldrich), 5 g lactulose (Sigma-Aldrich) og 2 g mannitol (Sigma-Aldrich) i 180 ml vann. I de påfølgende fem timene etter inntak av sukkerartene, samlet pasientene opp all deres urin i beholdere. Etter en og tre timer inntok pasientene 200 ml vann, og etter fire timer inntok de 150 ml vann. Dette for å sikre at pasientene klarte å avgi urin. To timer etter inntak av sukkeroppløsningen fikk pasientene en proteindrikk, slik at de fikk næring uten at det påvirket resultatet av sukkertesten. Proteindrikken ble blandet som anvist av produsenten (40 g Bodylab Whey Vanilla Milkshake oppløst i 250 ml væske), rismelk ble brukt som væske da kumelk kan inneholde lactulose og gi falskt positivt resultat.

Urinen som ble samlet opp i løpet av fem timer ble oppbevart i kjøleskap frem til sukkertesten ble avsluttet. Den oppsamlede urinen, utenom start-urinen, ble oppbevart i en større beholder. Prøvematerialet i den store beholderen ble veid (beholderens egenvekt ble trukket ifra) og densiteten ble målt med digitalt refraktometer (ATAGO PAL-10S). Den målte vekten og densiteten ble så brukt til å beregne prøvematerialets volum (formel 2). Tre ml fra start-urinen, og tre ml fra den oppsamlede urinen ble pipettert over i cryorør på 1 ml og oppbevart ved -80°C frem til analyse.

$$Volum(L) = \frac{masse(g)}{densitet(g/L)} \quad (2)$$

2.3 Optimalisering av kromatografimetode for deteksjon av sukkerarter

Optimalisering av kromatografimetode for deteksjon av sukkerartene mannitol, xylose og lactulose ble utført på Dionex ICS-6000 Ion Chromatography med detektoren Dionex ICS-6000 DC. Det ble benyttet to ulike Dionex CarboPac kolonnesett; PA20 og MA1.

Bufferløsninger ble laget som beskrevet på side 3 i applikasjonen «Determination of Carbohydrates in Urine by HPAE-PAD» utviklet av Thermo Fisher (Hurum & Rohrer, 2016), ved å fortynne 50% (w/w) natriumhydroksidløsning (Sigma-Aldrich) i avgasset ultrarent vann (Milli-Q).

2.3.1 Optimalisering av metode for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonnen

Optimaliseringen av mannitol- og xylosedeteksjon ble utført på kolonnesettet MA1. Det ble tatt utgangspunkt i applikasjonen fra Thermo Fisher (Hurum & Rohrer, 2016), der en NaOH-konsentrasjon i bufferløsningen på 480 mM og flow-hastighet på 0,40 mL/min ved 30 °C er anbefalt. En sukkerblanding med 0,10 mM mannitol, xylose og lactulose ble først analysert med nevnte betingelser.

Det ble laget to bufferløsninger med NaOH-konsentrasjon på 480 mM og 612 mM til analyse på MA1-kolonnen. Slik tabell 4 viser ble 50% (w/w) NaOH fortynnet i avgasset Milli-Q vann for å oppnå ønsket konsentrasjon.

Tabell 4: Oversikt over volum 50% (w/w) NaOH og masse avgasset Milli-Q vann som ble benyttet for å lage bufferløsninger med NaOH-konsentrasjon på 480 mM og 612 mM.

Konsentrasjon (mM)	Volum NaOH 50% (w/w) (mL)	Milli-Q vann, masse (g)
480	25,1	974,9
612	32,0	967,0

For å undersøke hvordan toppene endret seg ved ulik flow-hastighet, ble det analysert en sukkerløsning av 0,05 mM mannitol, xylose og lactulose. Bufferløsningens NaOH-konsentrasjon og temperatur var konstant på henholdsvis 480 mM og 30°C ved hver analyse, mens flow-hastigheten var 0,25 mL/min, 0,3 mL/min og 0,4 mL/min. Det ble også undersøkt hvordan gradient ville påvirke toppene. Det ble derfor først analysert en sukkerløsning av 0,10 mM mannitol, xylose og lactulose med en isokratisk metode, med betingelsene 480 mM NaOH og 0,30 mL/min flow-hastighet ved 30°C. Deretter ble samme sukkerløsning analysert med gradient med 300 mM NaOH-konsentrasjon fra 0-25 min, og deretter gradvis økning til 612 mM NaOH-konsentrasjon fra 25–50 min. Fra 50-60 min ble konsentrasjonen holdt stabil på 612 mM. Flow-hastigheten og temperaturen ble satt likt som den isokratiske metoden med 0,30 min/mL, og 30°C. Etter analysering med gradient, ble kolonnen re-ekvilibrert. Dette ble utført ved å “analysere” en vannprøve med samme NaOH-konsentrasjon i bufferløsningen, som neste prøve skulle analyseres med.

2.3.2 Optimalisering av metode for deteksjon av lactulose med HPAE-PAD og PA20-kolonnen

Optimaliseringen av lactulose-deteksjon ble utført på kolonnesettet PA20. For å undersøke hvordan toppen for lactulose endret seg i kromatogrammet ved ulik flow-hastighet, temperatur og NaOH-konsentrasjon i bufferløsningen, ble det analysert prøver med en konsentrasjon av lactulose på 33,3 μM i Milli-Q vann. Konsentrasjonen på 33,3 μM ble valgt for å unngå overbelastning av kolonnen. Urinprøver fra tilfeldig valgte pasienter ble også analysert med endringer av de ulike betingelsene, for å se hvordan dette påvirket toppene til sukkerartene i reelle urinprøver.

Det ble laget to bufferløsninger med NaOH-konsentrasjon på henholdsvis 200mM og 20mM, til analyse med PA20-kolonnen. Slik tabell 5 viser ble 50% (w/w) NaOH fortynnet i avgasset Milli-Q vann for å få ønskelig konsentrasjon.

Tabell 5: Oversikt over volum 50% (w/w) NaOH og masse avgasset Milli-Q vann som ble benyttet for å lage bufferløsninger med NaOH-konsentrasjon på 200mM og 20mM.

Konsentrasjon (mM)	Volum NaOH 50% (w/w) (mL)	Milli-Q vann, masse (g)
200	10,46	990,0
20	1,046	999,0

De ulike betingelsene som ble endret for å optimalisere lactulose-deteksjonen var NaOH-konsentrasjon i bufferløsningen, flow-hastighet og temperatur. På bakgrunn av tidligere analyserte prøver ble det valgt å standardisere betingelsene, med 30 mM NaOH-konsentrasjon, 0,20 mL/min flow-hastighet og en temperatur på 30°C som utgangspunkt. Videre ble én og én betingelse justert, mens de andre ble holdt konstant. På denne måten ble det tydeliggjort effekten av de ulike betingelsene på toppene i kromatogrammet. Tabell 6 viser hvilke endringer av de ulike betingelsene som ble utprøvd. For å rense kolonnen mellom hver analysering ble kolonnen rensset ved å legge til et tidsrom på slutten av hver analyse med ren 200 mM bufferløsning.

Tabell 6: Oversikt over de ulike endringene av NaOH-konsentrasjon, flow-hastighet og temperatur som ble utprøvd ved optimalisering av deteksjon av lactulose på PA20-kolonnen. Én og én betingelse ble endret, mens de øvrige ble holdt konstant.

NaOH-konsentrasjon (mM)	20	25	30	35	40	45
Flow-hastighet (mL/min)	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	-
Temperatur (°C)	20	30	40	-	-	-

2.4 Metode for analysering av pasientprøver med HPAE-PAD

2.4.1 Kalibrering av metode deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonnen

For å etablere kalibreringskurver for bestemmelse av mannitol- og xylosekonsentrasjoner i urinprøvene, ble det laget elleve standardløsninger med ulike konsentrasjoner av de nevnte sukkerartene. Disse ble analysert med samme bufferløsning og betingelser som pasientprøvene (vedlegg 1). Det ble laget stamløsninger av sukkerartene fra tørrstoff, før de ble fortynnet til de ulike konsentrasjonsnivåene. Tabell 7 viser masse (mg) av tørrstoffene som ble løst opp i Milli-Q vann for å få 1 liter stamløsning med en konsentrasjon på 10 mM.

Tabell 7: Oversikt over masse tørrstoff som ble benyttet for å lage 10 mM mannitol- og xylosestamløsninger, på bakgrunn av stoffenes molare masse.

Analytt, molar masse (g/mol)	Masse av tørrstoff (mg)
Mannitol: 182,17	821,7
Xylose: 150,13	1501,3

Videre ble 20 µL av hver stamløsning blandet med 1960 µL Milli-Q vann, for å lage en ny fortynning med en konsentrasjon på 0,10 mM. Deretter ble fem av standardene laget etter fortynningsrekken som tabell 8 viser.

Tabell 8: Oversikt over volum sukkerløsning og Milli-Q vann som ble blandet for å lage mannitol- og xylosestandardløsninger med ønskelige konsentrasjoner. Første standardløsning ble laget ved å fortynne løsningen med 0,10 mM av mannitol og xylose. De resterende løsningene ble laget ved å fortynne den foregående løsningen.

Konsentrasjon (mM)	Volum fra foregående fortynning (µL)	Milli-Q vann (µL)
0,05	1000	1000
0,01	400	1600
0,005	1000	1000
0,001	400	1600
0,0005	1000	1000

De fem resterende konsentrasjonene ble laget direkte fra stamløsningene av mannitol og xylose på 10 mM. Tabell 9 viser hvilket volum mannitol- og xylosestamløsning ble fortynnet med Milli-Q vann, for å oppnå ønskede konsentrasjoner.

Tabell 9: Oversikt over volum av stamløsning og Milli-Q vann som ble blandet for å lage standardløsninger med ønskelige konsentrasjoner. Løsningene ble alle laget ved å fortynne stamløsningene av mannitol og xylose (10mM), unntatt 0,02 mM-løsningen, som ble laget ved å fortynne 0,20 mM-løsningen 1:10.

Konsentrasjon (mM)	Volum 10 mM mannitol (µL)	Volum 10mM xylose (µL)	Milli-Q vann (µL)
0,20	20	20	960
0,18	18	18	964
0,13	13	13	974
0,075	7,5	7,5	985
0,02	Fortynnet 0,20 mM-løsningen 1:10 (100 µL 0,20 mM-løsning+ 900 µL vann)		

Standardløsningene ble analysert, og lagt inn i dataprogrammet slik at det ble laget kalibreringskurver for sukkerartene. Deretter ble det gjort korrelasjonsanalyser mellom konsentrasjon og signal av analyttene.

2.4.2 Kvalitetskontroll av metoden for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonnen

For å kontrollere mulige pipetteringsfeil, fortynningsfeil og feil under analysen ble det testet ulike interne standarder (IS). Cellobiose, som er en sukkerart, ble anbefalt som IS i applikasjonen fra Thermo Fisher (Hurum & Rohrer, 2016), og ble derfor testet først. Dette ble utført ved å lage tre løsninger med konsentrasjoner på 0,10 mM, 0,05 mM og 0,01 mM av cellobiose i Milli-Q vann, og analysert med samme betingelser som pasientprøvene. Videre ble det analysert pasientprøver for å undersøke om det var noen komponenter i urinen som eluerte i samme tidsrom som cellobiose, og som dermed ville overlape med cellobiose-toppen. Sukkeret melibiose (Barboza Jr. et al., 1999) ble også testet som mulig IS, og det ble analysert en løsning med 0,05 mM melibiose.

Fortynnet human urin ble analysert for å vurdere om det var egnet som daglig kontroll. Urinen ble sentrifugert, og supernatanten deretter fortynnet 1:4000. Videre ble alikvoter fordelt i 1,5 mL eppendorfrør og fryst ned i -80°C. En ny kontroll ble tint opp og analysert hver dag, over en periode på seks dager.

I tillegg til å vurdere human urin som daglig kontroll, ble en syntetisk kontroll bestående av 0,10 mM mannitol og xylose vurdert. Det ble laget totalt 20 alikvoter ved å fortynne 10 µL av 10 mM mannitol og 10 µL av 10 mM xylose til et sluttvolum på 1 mL i hvert eppendorfrør. Deretter ble kontrollene fryst ned til -80 °C. Løsningene på 10 mM er de samme løsningene som er benyttet til å lage kalibreringskurve for metoden. En ny kontroll ble tint opp og analysert hver dag, over en periode på tre dager. Det ble deretter laget kontrollkort for å kontrollere reproduserbarheten til sukkerløsningen.

2.4.3 Fortynning og analysering av pasientprøver for kvantifisering av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonnen

For å finne en velegnet fortynningsgrad ved analyse av pasientprøvene, ble én pasientprøve analysert med to ulike fortynninger. Prøvene ble analysert med fortynning 1:500 og 1:1000 og

konsentrasjonen av mannitol og xylose ble vurdert opp mot linearitetsområdet bestemt ut ifra kalibreringskurven.

56 urinprøver fra pasientene ble analysert for å vurdere metodens evne til å måle konsentrasjon av mannitol og xylose presist og riktig. Prøver fra 8 pasienter fra intervensjonsgruppen, og 6 pasienter fra kontrollgruppen ble analysert i to paralleller, både fra baseline og FU. Det ble laget en randomisert liste over pasientene, slik at pasientprøvene ble analysert i tilfeldig rekkefølge. Urinprøvene lagret ved -80 °C ble tint opp i romtemperatur. Deretter ble prøvene sentrifugert ved 1500 G ved 4 °C i 5 minutter. Supernatanten ble pipettert over i et eppendorfrør og merket med ID og dato for prøvetaking. Deretter ble supernatanten fortynnet 1:500, 1:1000 eller 1:2000 ut ifra diuresen til pasienten. Analysebetingelsene ble holdt konstant med flow-hastighet på 0,40 mL/min, isokratisk NaOH-konsentrasjon på 480 mM i bufferløsningen, og en temperatur på 30 °C. En mer detaljert fremgangsmåte for analysering av pasientprøver er beskrevet i vedlegg 1.

2.4.4 Validering av metode for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonnen

Variasjonen i detektert konsentrasjon av mannitol og xylose mellom parallellene for prøvene ble beregnet. Deretter ble det vurdert om det er hensiktsmessig å analysere paralleller, eller om det er unødvendig bruk av tid og bufferløsning. Variasjonskoeffisienten (CV) mellom parallell 1 og 2 ble beregnet ut ifra standardavvik (SD) og middelværdi, slik formel 3 viser.

$$\%CV = \frac{\text{standardavvik (SD)}}{\text{middelværdi}(\bar{x})} * 100\% \quad (3)$$

Recovery ble også beregnet som et trinn i validering av metoden for deteksjon av mannitol og xylose. For å beregne recovery ble en pasientprøve analysert i tre replikater ved to ulike fortynningsgrader, 1:100 og 1:1000. Retensjonstid og areal for mannitol- og xylosetoppen ble notert. Videre ble replikatene av fortynningene tilsatt en løsning av mannitol og xylose til en konsentrasjon i prøvene på 0,05 mM, før de på nytt ble analysert. Retensjonstid og areal ble igjen notert. I tillegg ble det analysert en ren 0,05 mM løsning av mannitol og xylose. CV mellom replikatene av pasientprøve, pasientprøve tilsatt sukkerartene og ren sukkerløsning ble så beregnet (formel 3).

Videre ble formel 4 benyttet for å beregne grad av gjenfinning av analytt i prøvene (Harvey, 2016). Dette ble beregnet for både mannitol og xylose i hver replikat i hver av fortynningene. Et gjennomsnitt av recovery for replikatene, både for mannitol og xylose i begge konsentrasjonene, ble også beregnet.

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{\text{Målt total konsentrasjon i prøven}}{\text{Tilsatt konsentrasjon} + \text{kjent konsentrasjon i prøven før tilsats}} \quad (4)$$

2.5 Spørreskjemaer og utarbeidelse av glutenscore

Til vårt prosjekt ble vi gitt tilgang til spørreskjemaer som pasientene i forskningsprosjektet har fylt ut. Disse inneholder informasjon om pasientenes livsstil, helse og livskvalitet ved baseline og FU, samt loggføring av deres gluteninntak hver måned. Svarene på spørreskjemaene fra pasientene ble lagt inn manuelt to ganger i et dataprogram som heter REDCap. Deretter ble data overført til Excel for videre beregninger. Det ble kontrollert at begge paralleller av den manuelle inntastingen var korrekt, i forhold til pasientenes svar. Eventuelle feil ble rettet.

Spørreskjemaer om generelle opplysninger, livsstil og helse ved oppstart av prosjektet ble benyttet for å beskrive intervensjonsgruppen og kontrollgruppen. Her ble faktorene kjønn, alder, BMI, røyking, alkoholinntak og utdanningsnivå for gruppene sammenlignet.

For å gjøre utregninger av pasientenes glutentinntak i løpet av prosjektperioden, ble det benyttet Food Frequency Questionnaires (FFQ) som pasientene fylte ut hver måned. FFQ inneholder informasjon om hvor mye deltakerne har spist av ulike glutenholdige matvarer, som blant annet rugbrød, pasta og soyasaus. FFQ ble benyttet til å beregne glutenscoren til hver pasient for hver måned. Glutenscoren ble beregnet ut ifra matvarens gluteninnhold per 100 g, bestemt vha. DTU fødevarerdatabanken (*Frida - Database med fødevarerdata udgivet DTU Fødevarer instituttet, 2022*). For matvarer der den primære proteinkilden var hvete, rug eller bygg, ble gluteninnholdet estimert på bakgrunn av at disse kornsortene inneholder henholdsvis 80%, 65% og 50% gluten (Hoppe et al., 2013). For matvarer der gluten ikke utgjorde det primære bidraget til proteininnholdet, ble det estimert hvor mye av proteinet som stammet fra gluten, og gluteninnholdet i matvaren ble beregnet ut ifra dette.

Porsjonsstørrelsene ble estimert basert på standardiserte porsjonsstørrelser fra DTU

fødevareinstituttet (Ygil, 2013), i tillegg til sunn fornuft for de matvarer som ikke var å finne i dette dokumentet.

Det ble også gitt poeng til pasientene ut ifra hyppigheten av inntaket av den glutenholdige matvaren i løpet av en måned. Det gis mest poeng dersom en har spist den aktuelle matvaren hver dag, og synkende poengscore jo sjeldnere matvaren er inntatt, slik tabell 10 viser.

Deretter ble beregnet gluteninnhold (g) i matvaregruppene multiplisert med poengene basert på hyppighet (tabell 10). På denne måten ble en glutenscore for hver måned beregnet for hver pasient.

Tabell 10: Fordelingen av poeng basert på hvor hyppig pasienten har spist en glutenholdig matvare i løpet av en måned. Poengene benyttes i beregning av glutenscoren til pasienten, sammen med beregnet gluteninnhold pr. porsjon av de ulike matvarene.

Hyppighet	Flere ganger daglig	Daglig	5-6 ganger i uken	2-4 ganger i uken	Én gang i uken	1-3 ganger i måneden	0 ganger i måneden
Poeng	56	28	22	12	4	2	0

2.6 Databehandling

Statistiske beregninger ble gjennomført både ved hjelp av dataprogrammet R studio® (R Core Team, 2020) og Excel. Statistisk signifikans defineres som $p < 0,05$.

Pasientkarakteristikk ved baseline omfatter variablene kjønn, alder, BMI, røyke- og alkoholvaner samt utdannelsesnivå. Dette ble behandlet i R studio®. Siden fordelingen av pasientene i intervensjonsgruppen og kontrollgruppen ikke var randomisert, var det nødvendig å sammenligne de nevnte variablene mellom gruppene. Det ble undersøkt om det er store forskjeller mellom gruppene som det må tas hensyn til når resultatene av sukkertesten skal diskuteres. Dataene for variablene ble vurdert til å ikke være normalfordelt, og det ble derfor beregnet median og «interquartile range» (IQR). Disse beregningene ble kun utført på de kvantitative variablene; BMI og alder, ettersom de kategoriske variablene; kjønn, utdannelsesnivå, røyke- og alkoholvaner, er ikke-numeriske variabler.

Både for de kvantitative variablene og de kategoriske variablene ble det beregnet p-verdi for å vurdere om fordelingen er signifikant forskjellig mellom intervensjonsgruppen og kontrollgruppen.

Siden de kategoriske variablene ikke var normalfordelt, ble p-verdi beregnet med en Chi-kvadrat-test, hvor to ikke-parede grupper ble sammenlignet. For de numeriske variablene, alder og BMI, ble det utført en Wilcoxon rank sum test, der det også ble sammenlignet to ikke-parede grupper.

Ved bearbeidelsen av glutenscoren ble dataprogrammet Excel benyttet. Den samlede glutenscoren for hver pasient for hver måned ble benyttet til å lage et boksplokk. Her ble spredningen i gluteninntaket mellom intervensjonsgruppen og kontrollgruppen ved hver måned sammenlignet.

Da det ikke ble analysert en tilstrekkelig mengde pasientprøver, ble mannitol- og xyloseresultatene antatt å ikke være normalfordelt. Resultatet ble derfor presentert som median og IQR ved hjelp av R studio®. P-verdi mellom intervensjonsgruppen og kontrollgruppen, både ved baseline og FU, ble beregnet ved bruk av Wilcoxon rank sum test. P-verdien innad i gruppene ble også beregnet, der baseline og FU ble sammenlignet, ved bruk av tosidig ikke-paret t-test.

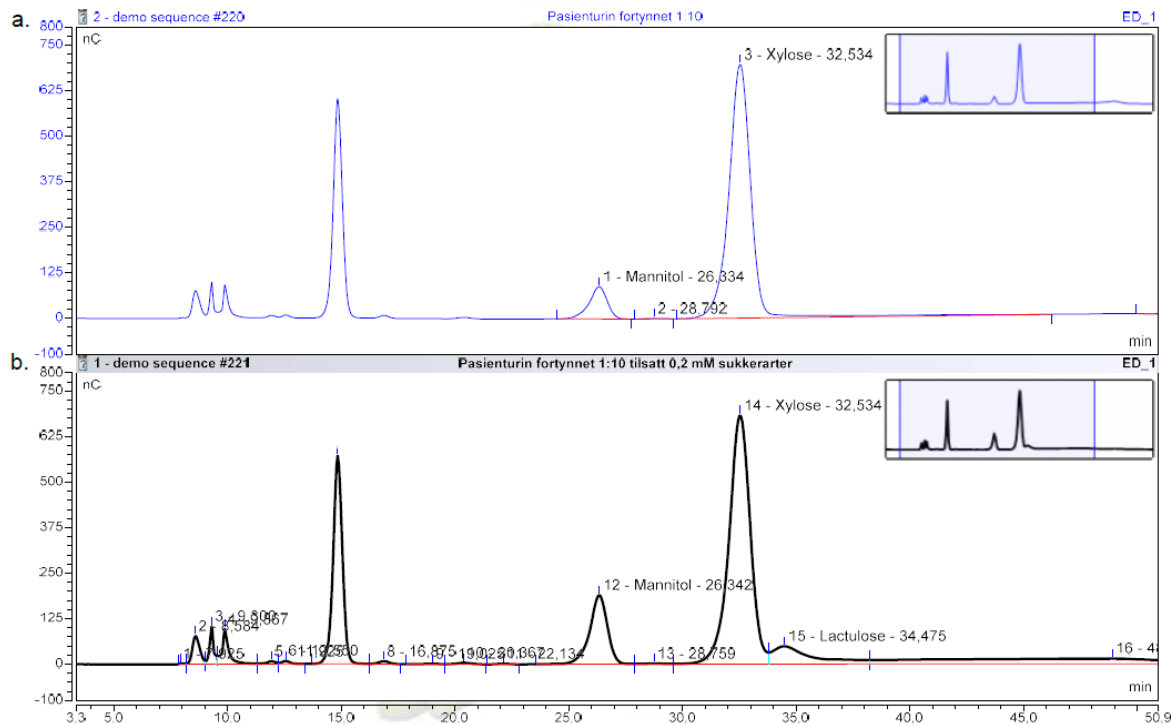
3.0 Resultater

3.1 Bakgrunn for optimalisering av deteksjonsmetode for mannitol, xylose og lactulose i urin

Opprinnelig var det tenkt å analysere pasientprøver med HPAE-PAD med MA1-kolonnen, ved å følge metode 2 (side 6, figur 4) i applikasjonen "Determination of Carbohydrates in Urine by HPAE-PAD" utarbeidet av Thermo Fisher (Hurum & Rohrer, 2016). Denne metoden, som er utarbeidet ved bruk av syntetisk urin tilsatt ulike sukkerarter, viste seg imidlertid å være uegnet til påvisning av sukkerartene mannitol, xylose og lactulose i pasientprøvene i dette prosjektet (muntlig meddelelse fra veileder). Figur 8a viser kromatogram fra en pasientprøve fortynnet 1:10 og analysert med HPAE-PAD og MA1-kolonnen. Figuren viser at det er dårlig resolusjon mellom xylose og lactulose, da det er liten forskjell i deres retensjonstid og toppene ligger nære hverandre. Mengden xylose pasientene konsumerte under sukkertesten var fire ganger høyere enn mengden lactulose, og i tillegg er mengde xylose som tas opp i tynntarmen høyere enn opptaket av lactulose. Derfor vil toppen for xylose være meget høy i pasientenes urin, slik at eventuell lactulose i prøven vil elueres i "halen" til xylose-topp. Figur 8b viser kromatogram fra analyse av samme pasientprøve, med samme betingelser, tilsatt 0,2 mM mannitol, xylose og lactulose. Figuren viser hvor lactulose danner en topp ved høyere konsentrasjon, og at toppen ligger i "halen" til xylose.

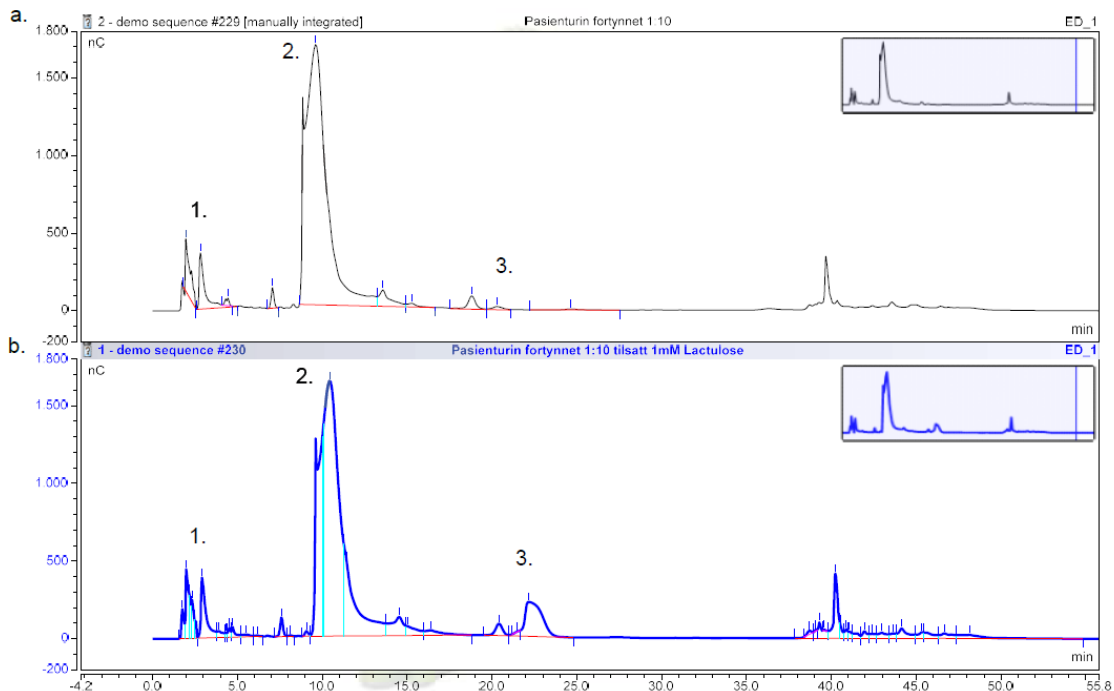
Deretter ble det testet om metode 1 (side 4, figur 1) i applikasjonen fra Thermo Fisher (Hurum & Rohrer, 2016) med PA20-kolonnen ville fungere bedre for å detektere sukkerartene. Denne metoden fungerte heller ikke ideelt. Figur 9a viser kromatogrammet fra en pasientprøve fortynnet 1:10, analysert med PA20-kolonnen. Figuren viser at mannitol har kort retensjonstid ved bruk av denne kolonnen (rundt 2 minutter). Dette er fordi mannitol ikke binder seg godt til kolonnematerialet, og det skjer derfor ingen ionebytter-prosess. Dette fører til at sukkeret beveger seg raskt ut av kolonnen. Figur 9b viser samme pasientprøve tilsatt 0,20 mM lactulose, for å visualisere hvor denne sukkerarten danner topp ved høyere konsentrasjon. Det er mye støy i kromatogrammet som kommer fra ulike komponenter i human urin, slik figur 9a og 9b også viser. Ettersom konsentrasjonen av lactulose normalt er lav i human urin, er sukkeret vanskelig å skille fra øvrige komponenter i urinen. Det ble på

bakgrunn av dette bestemt å gjøre optimaliseringer på MA1-kolonnen for deteksjon av mannitol og xylose, og optimaliseringer på PA20-kolonnen for deteksjon av lactulose.



Figur 8: a.: Analyse av pasienturin fortynnet 1:10 på MA1-kolonnen. Mannitol elueres ved 26,3 minutter, xylose ved 32,5 minutter, mens lactulose ikke er detektert. Prøven er analysert med NaOH-konsentrasjon på 480 mM, og flow-hastighet på 0,3 mL/min, ved 40°C.

b.: Analyse av samme pasienturin fortynnet 1:10, tilsatt 0,2 mM mannitol, xylose og lactulose. Dette illustrerer at xylose og lactulose ikke separeres godt nok med MA1-kolonnen (metode 2: side 6, figur 4) (Hurum & Rohrer, 2016). Prøven er analysert med NaOH-konsentrasjon på 480 mM, og flow-hastighet på 0,3 mL/min, ved 40°C.



Figur 9: a.: Analyse av pasienturin fortynnet 1:10 på PA20-kolonnen (metode 1: side 4, figur 1) (Hurum & Rohrer, 2016). a1. Mannitol elueres rundt 2 minutter, sammen med andre komponenter fra urinen. a2. Xylose elueres ved 11 minutter. a3. Lav konsentrasjon lactulose detekteres ved 20 minutter. Prøven er analysert med NaOH-konsentrasjon på 20 mM, og flow-hastighet på 0,3 mL/min og temperatur på 30°C.

b.: Analyse av samme pasienturin fortynnet 1:10 på PA20-kolonnen, tilsatt 1 mM lactulose. b1. Mannitol elueres ved samme tid som i figur 9a. b2. Xylose elueres ved samme tid som i figur 9a. b3. Tilsatt lactulose detekteres ved 22 minutter, og illustrerer hvor dette sukkeret ville vært dersom pasienturinen hadde høyere konsentrasjon av lactulose. Prøven er analysert med NaOH-konsentrasjon på 20 mM, og flow-hastighet på 0,3 mL/min og temperatur på 30°C.

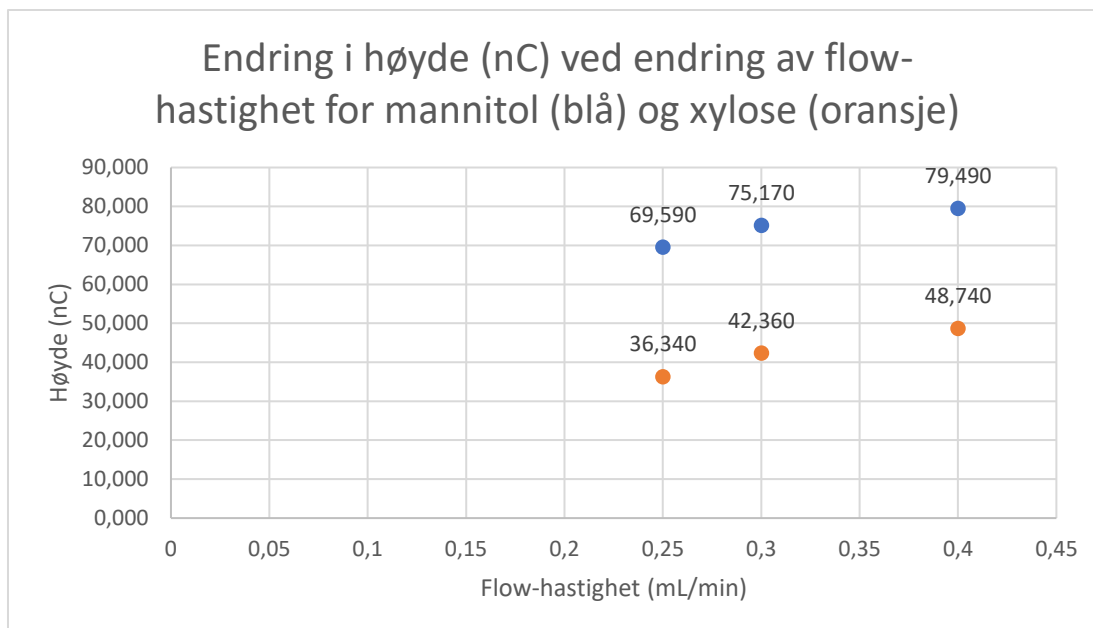
3.2 Optimalisering av metoden for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonne

For deteksjon av mannitol og xylose ble det besluttet at MA1-kolonnen skulle benyttes, og det ble tatt utgangspunkt i metode 2 (side 6, figur 4) fra applikasjonen til Thermo Fisher (Hurum & Rohrer, 2016). Det ble gjort flere utprøvinger for å finne gunstige innstillinger med flow-hastighet og NaOH-konsentrasjon som separerte xylose og lactulose best. På denne måten skulle det være mulig å kvantifisere xylosen, samtidig som mannitol ble detektert med

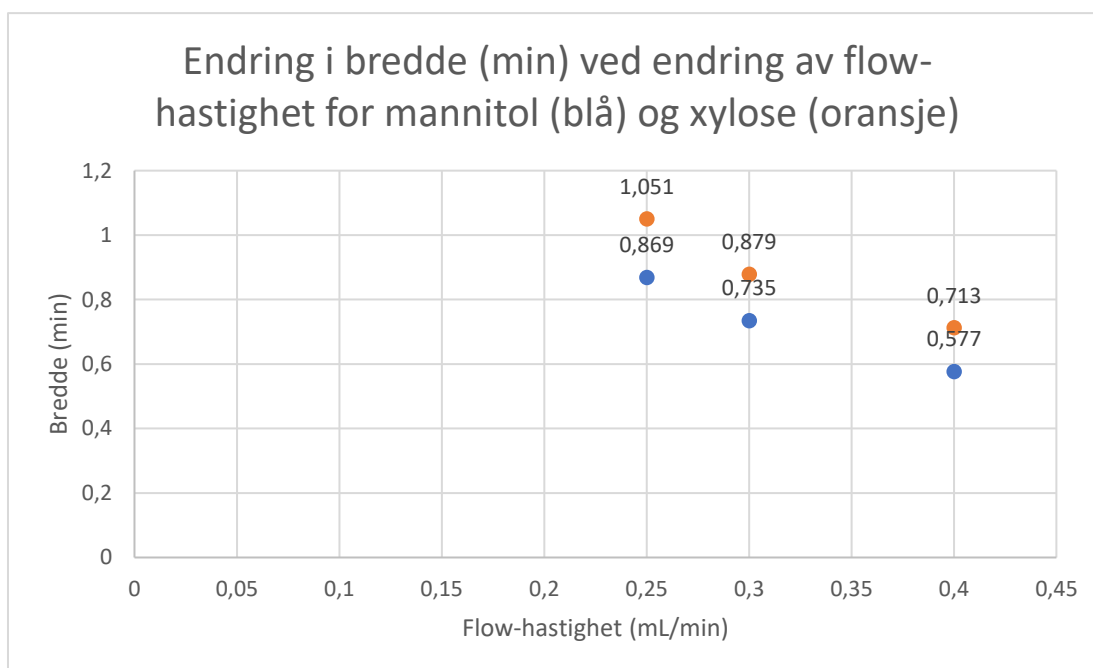
sikkerhet. Det ble bestemt at temperatur i kolonnen skal være samme som i applikasjonen, nemlig 30° C.

3.2.1 Ved analyse av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonne fører økt flow-hastighet til topper med økt høyde, smalere bredde, lavere areal og kortere retensjonstid

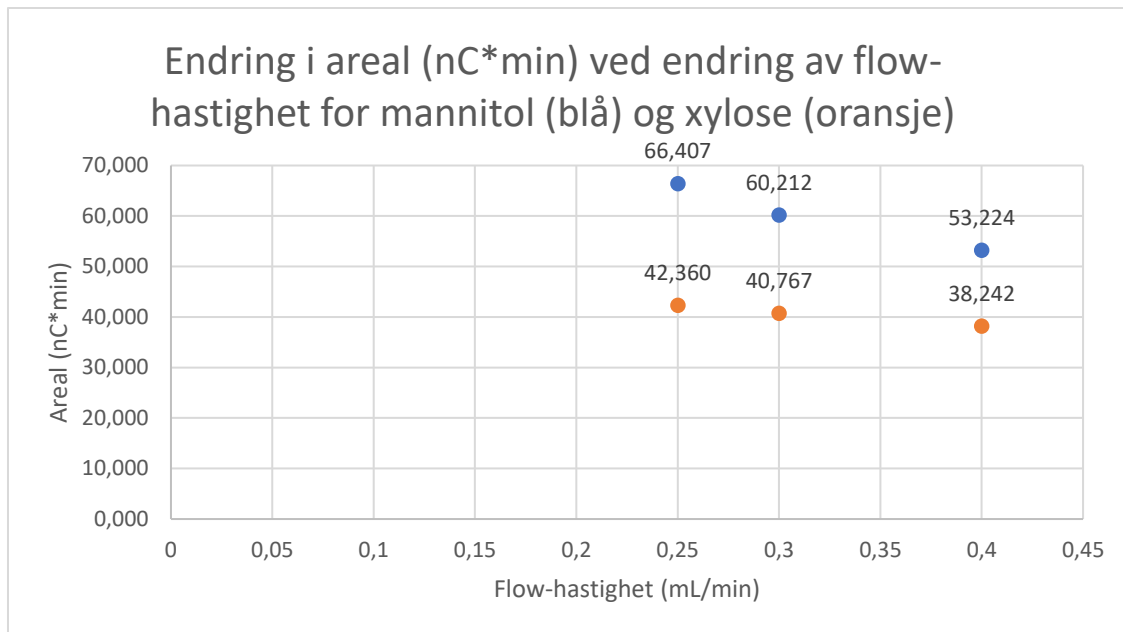
Det ble analysert en sukkerblanding med konsentrasjon 0,05 mM mannitol, xylose og lactulose med varierende flow-hastighet. Hensikten var å finne den hastigheten som vil gi best separasjon av xylose fra lactulose slik at toppene ble så høye og smale som mulig. De målte verdiene for sukkerløsningen analysert med varierende flow-hastighet er presentert i vedlegg 4. Disse verdiene er presentert i punktdiagram i figur 10 til 13, der mannitol representerer blå punkter, og xylose representerer oransje punkter. Figur 10 viser at da flow-hastigheten økte fra 0,25 mL/min til 0,30 mL/min og deretter til 0,40 mL/min, økte høyden av mannitol-toppen. Bredden for toppene minket med stigende flow-hastighet, slik figur 11 viser. I tillegg minket arealet for mannitol-toppen ved økt flow-hastighet, slik figur 12 viser. Retensjonstiden for mannitol-toppen ble kortere ved høyere flow-hastighet, slik figur 13 viser. Samme tendens ses også for xylose, hvor høyden økte (figur 10), bredden og arealet ble mindre (figur 11 og 12) og retensjonstiden ble kortere (figur 13) med økte flow-hastighet.



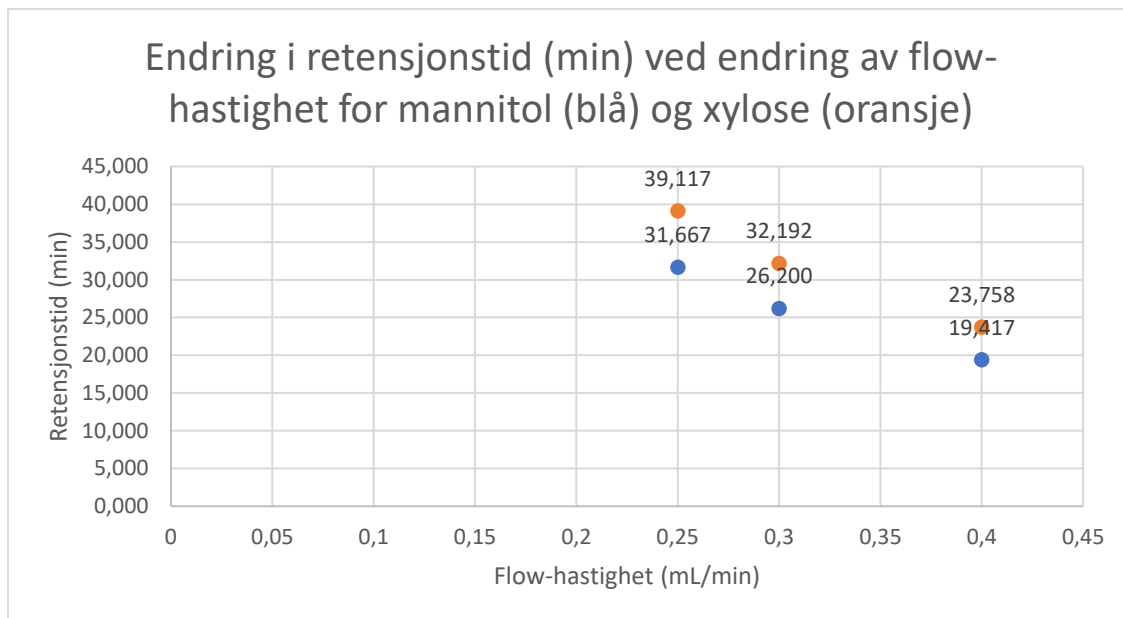
Figur 10: Høyden til toppen for mannitol (blå) og xylose (oransje) øker ved økt flow-hastighet. MA1-kolonnen er benyttet, ved temperatur på 30°C, NaOH-konsentrasjon på 480 mM, og varierende flow-hastighet.



Figur 11: Bredden til toppen for mannitol (blå) og xylose (oransje) blir kortere ved høyere flow-hastighet. MA1-kolonnen er benyttet, ved temperatur på 30°C, NaOH-konsentrasjon på 480 mM, og varierende flow-hastighet.



Figur 12: Arealet til toppen for mannitol (blå) og xylose (oransje) minker når flow-hastigheten øker. MA1-kolonnen er benyttet, ved temperatur på 30°C, NaOH-konsentrasjon på 480 mM, og varierende flow-hastighet.

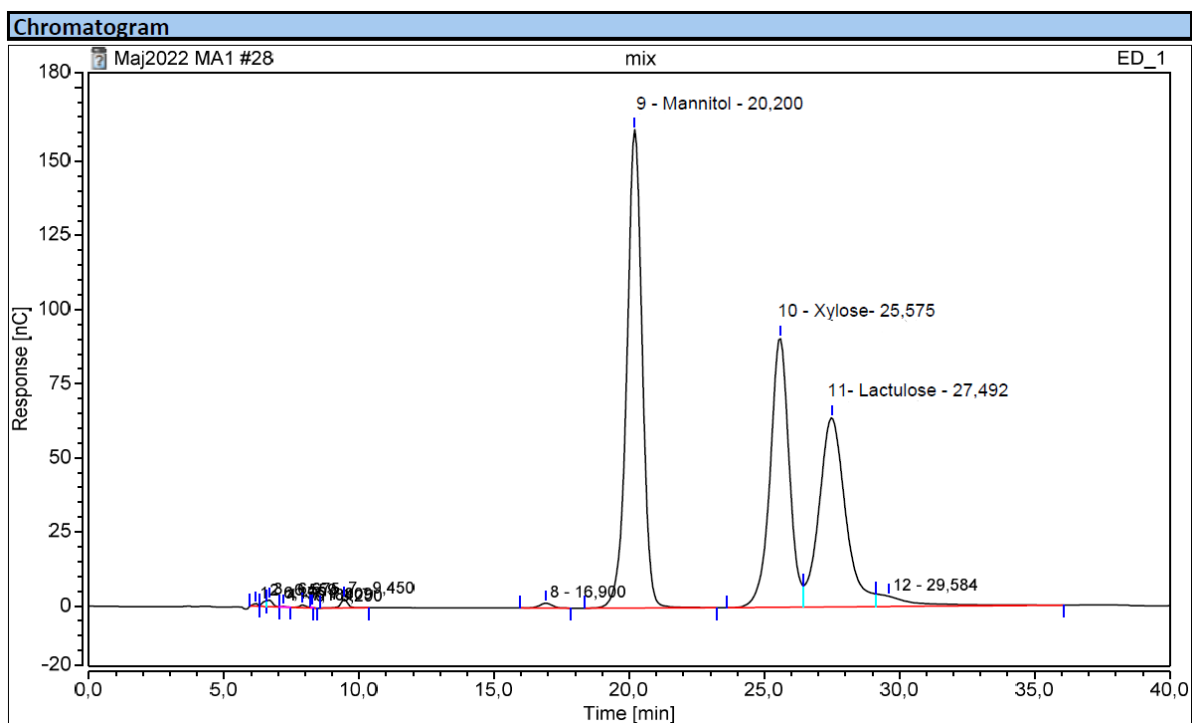


Figur 13: Retensjonstiden til toppen for mannitol (blå) og xylose (oransje) blir kortere ved høyere flow-hastighet. MA1-kolonnen er benyttet, ved temperatur på 30°C, NaOH-konsentrasjon på 480 mM, og varierende flow-hastighet.

3.2.2 Utprøvd isokratisk NaOH-konsentrasjon er foretrukket framfor utprøvd gradient med HPAE-PAD og MA1-kolonne

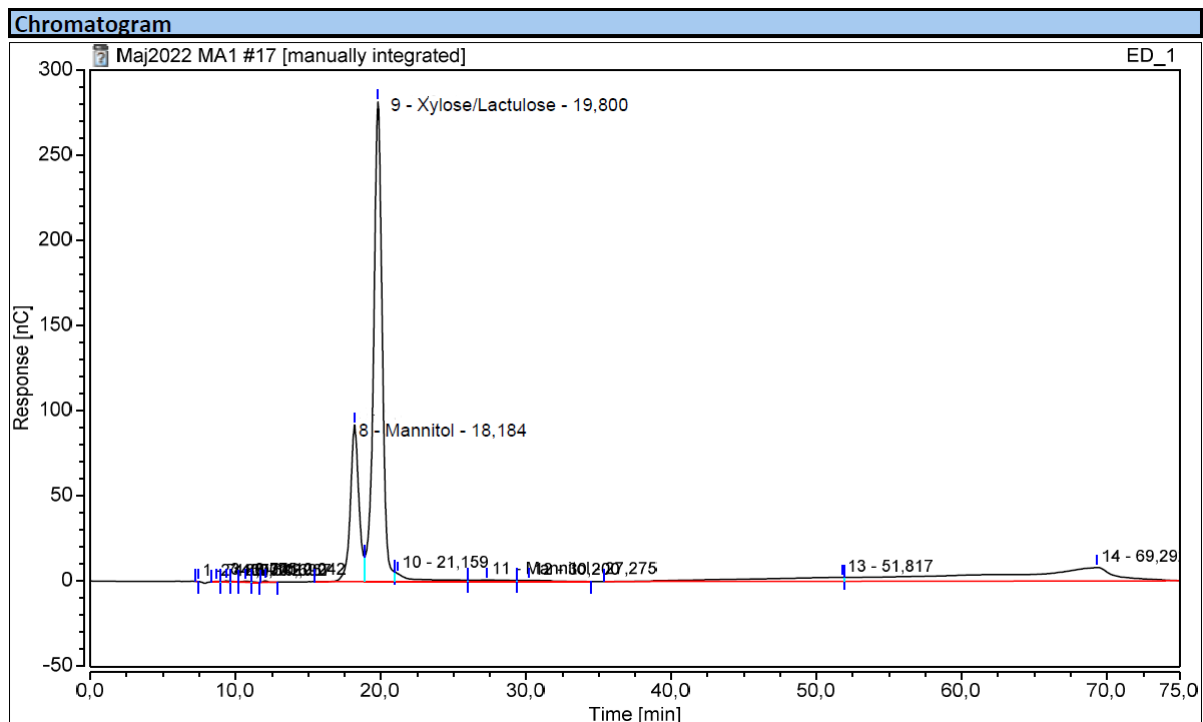
En sukkerløsning ble analysert med både konsentrasjonsgradient og isokratisk NaOH-konsentrasjon, for å undersøke hva som ga best separasjon av xylose og lactulose. Først ble sukkerløsningen med 0,10 mM mannitol, xylose og lactulose analysert isokratisk med betingelsene 480 mM NaOH og 0,40 mL/min flow-hastighet ved 30°C. Figur 14 viser kromatogrammet fra analysen. Mannitol ble eluert først med en retensjonstid på 20,20 minutter og ble tydelig separert fra de andre sukkerartene. Xylose fikk en retensjonstid på 25,58 minutter, og overlapper noe med lactulose som fikk en retensjonstid på 27,49 minutter. Resolusjonen mellom toppen for xylose og toppen for lactulose ble beregnet slik formel 5 viser.

$$R_S = \frac{2[27,492 - [25,575]]}{0,728 + 0,999} = 2,22 \quad (5)$$



Figur 14: Sukkerløsning på 0,10 mM mannitol, xylose og lactulose analysert med isokratisk metode (480 mM NaOH) på MA1-kolonnen. MA1-kolonnen er benyttet med temperaturen på 30°C og flow-hastigheten på 0,4 mL/min.

Samme sukkerløsning på 0,10 mM ble analysert med gradient der NaOH-konsentrasjonen gradvis økte fra 300 mM til 612 mM etter 25 minutter. Figur 15 viser kromatogrammet fra analysen. Mannitol ble eluert først med en retensjonstid på 18,18 minutter, men ble ikke fullstendig separert fra den neste toppen med retensjonstiden 19,80 minutter som representerer både xylose og lactulose. Figuren viser at toppen for xylose og lactulose eluerte ved samme tid, og resolusjonen er ikke mulig å beregne.



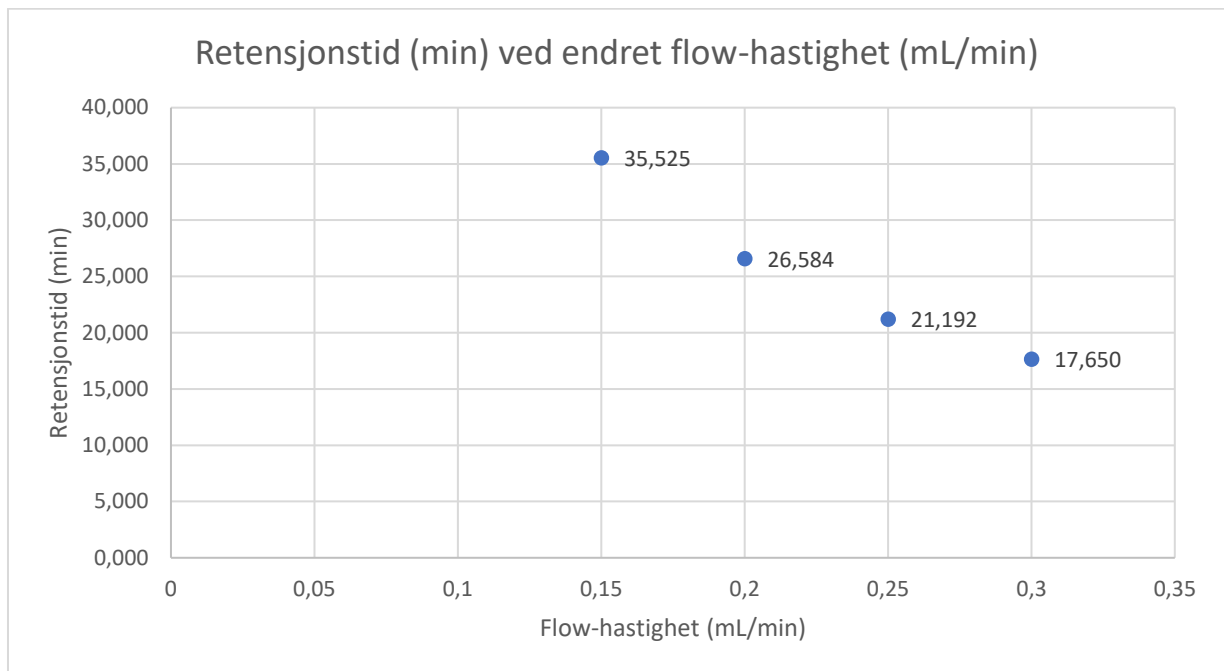
Figur 15: Sukkerløsning på 0,10 mM mannitol, xylose og lactulose analysert med gradert NaOH-konsentrasjon: 300 mM fra 0-25 minutter, deretter 612 mM fra 25-50 minutter, til slutt 612 mM fra 50-60 minutter. MA1-kolonnen er benyttet med temperaturen på 30°C og flow-hastigheten på 0,3 mL/min.

3.3 Optimalisering av metoden for deteksjon av lactulose med HPAE-PAD og PA20-kolonnen

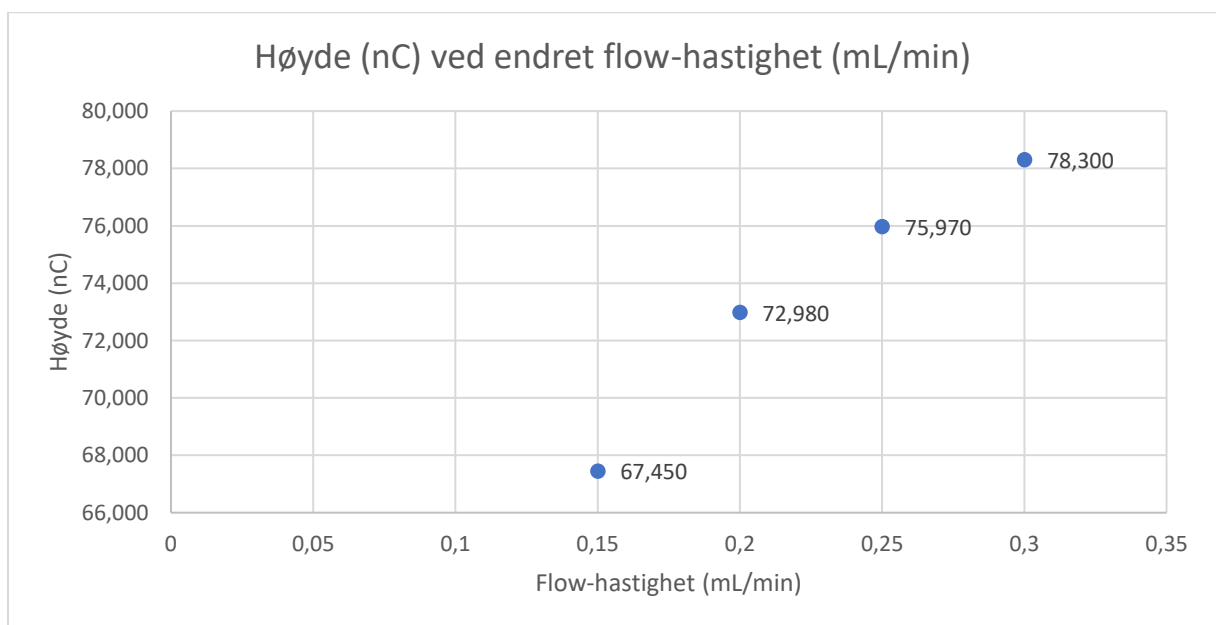
Ettersom konsentrasjonen av lactulose i urin for friske mennesker er meget lav, ble det sett på ulike faktorer som kunne bedre sensitiviteten for dette sukkeret på PA20-kolonnen. Det ble gjort utprøvinger av flow-hastighet, NaOH-konsentrasjon og temperatur, for å finne de betingelsene som best kvantifiserte lactulose med PA20-kolonnen.

3.3.1 Ved analyse av lactulose med HPAE-PAD og PA20-kolonnen fører økt flow-hastighet til kortere retensjonstid, og topper med økt høyde, smalere bredde og lavere areal

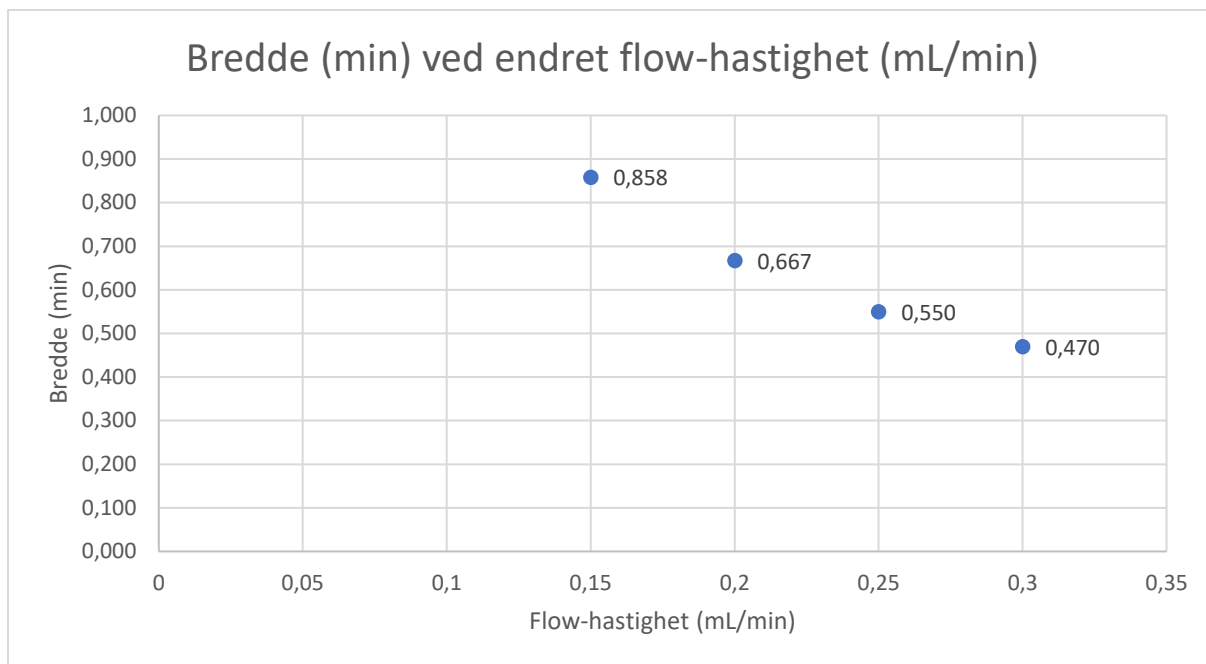
For å bestemme hvilken flow-hastighet som gir best resolusjon, ble det gjort forsøk med ulike flow-hastigheter. NaOH- konsentrasjonen og temperaturen ble holdt konstant på henholdsvis 30mM og 30°C. Utprøvingene ble utført med en løsning på 3,33 mM lactulose i vann. Flow-hastigheten ble satt opp fra 0,15 til 0,30 mL/min med et intervall på 0,05 mL/min. De målte verdier for sukkerløsningen analysert med varierende flow-hastighet er presentert i tabell 5.1, i vedlegg 5. Figur 16-19 viser hvordan henholdsvis retensjonstid, høyde, bredde og areal endret seg med økende flow-hastighet. Figur 16 viser at da flow-hastigheten ble satt opp fra 0,15 mL/min til 0,20 mL/min og 0,30 mL/min, minket retensjonstiden til lactulose. Høyden til lactulose-toppen økte ved økt flow-hastighet, slik figur 17 viser. Figur 18 viser at bredden på lactulose-toppen minket ved økt flow-hastighet. Til slutt viser figur 19 at arealet til lactulose toppen minket da flow-hastigheten økte.



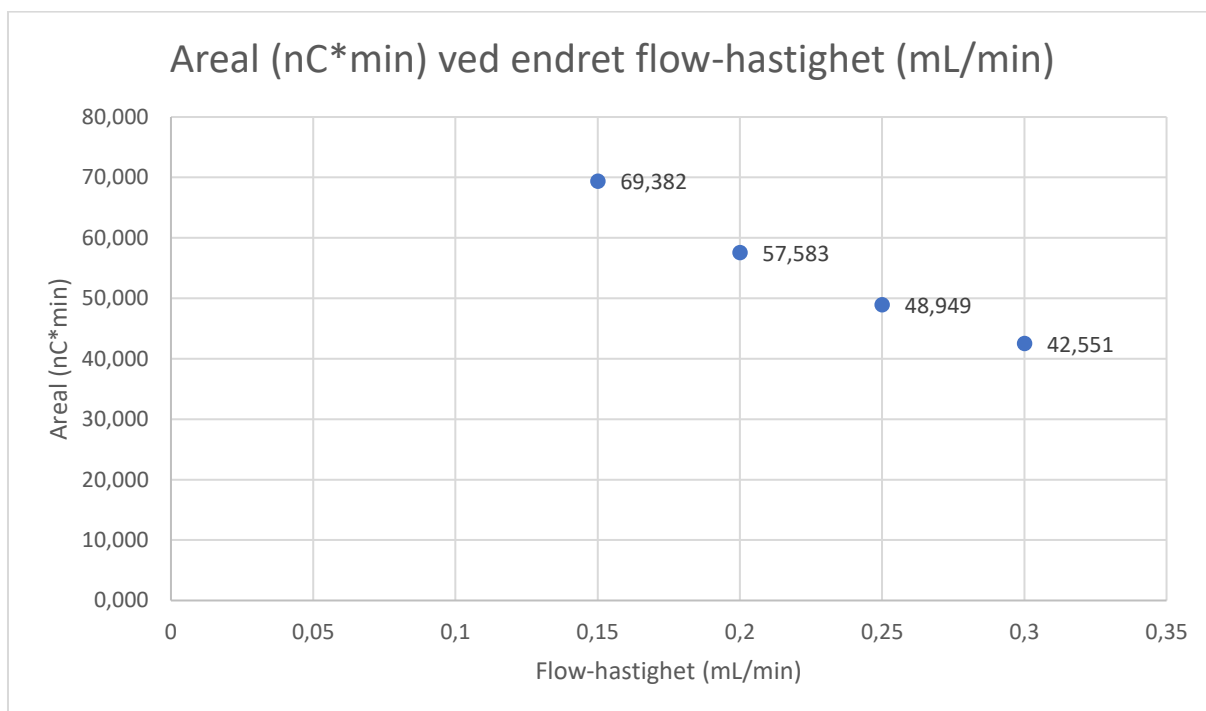
Figur 16: Retensjonstiden til toppen for lactulose blir kortere ved høyere flow-hastighet. PA20-kolonnen er benyttet med temperatur på 30°C, NaOH-konsentrasjon på 30 mM, og varierende flow-hastighet.



Figur 17: Høyden til toppen for lactulose øker ved økt flow-hastighet. PA20-kolonnen er benyttet, med temperatur på 30°C, NaOH-konsentrasjon på 30 mM, og varierende flow-hastighet.



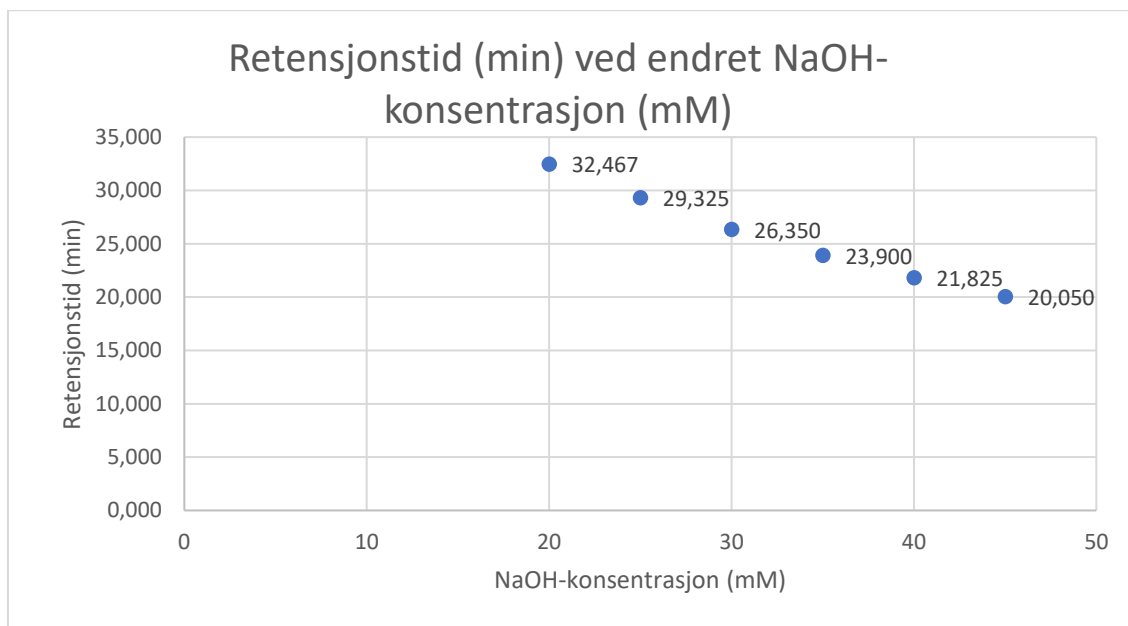
Figur 18: Bredden på toppen for lactulose minker ved økt flow-hastighet. PA20-kolonnen er benyttet med ved temperatur på 30°C, NaOH-konsentrasjon på 30 mM, og varierende flow-hastighet.



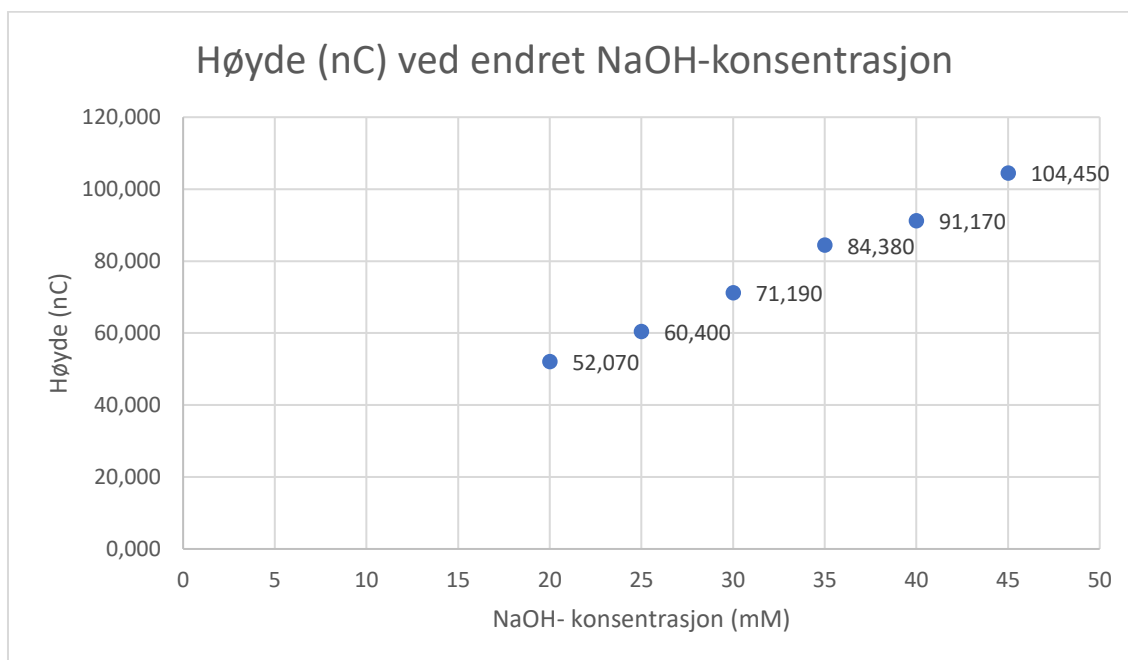
Figur 19: Arealet til toppen til lactulose minker når flow-hastigheten øker. PA20-kolonnen er benyttet med temperatur på 30°C, NaOH-konsentrasjon på 30 mM, og varierende flow-hastighet.

3.3.2 Ved analyse av lactulose med HPAE-PAD og PA20-kolonne fører økt NaOH-konsentrasjon til kortere retensjonstid, og toppe med økt høyde, smalere bredde og større areal

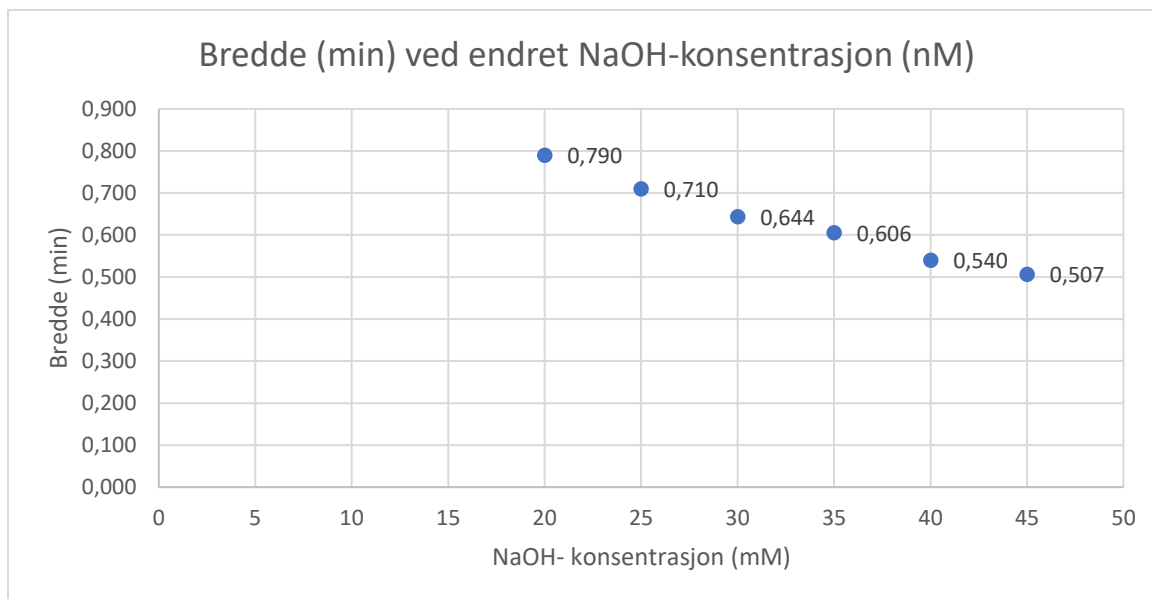
NaOH-konsentrasjonen er en viktig variabel for separasjon av sukkerartene med HPAE-PAD, da det påvirker hvor godt anionene i prøven binder seg til kolonnen. Det ble gjort forsøk med ulike NaOH-konsentrasjoner på bufferløsningen, og flow-hastighet og temperatur ble holdt konstant på henholdsvis 0,20 mL/min på 30°C. Utprøvingene ble gjennomført med en løsning på 3,33 mM lactulose i vann. NaOH-konsentrasjonen ble satt opp med 5 mM fra 20 mM til 45 mM. De målte verdier for sukkerløsningen analysert med varierende NaOH-konsentrasjon er presentert i tabell 5.2, i vedlegg 5. Slik figur 20 viser, førte en økning i NaOH-konsentrasjon fra 20 mM og 45 mM til at retensjonstiden sank. I tillegg økte høyden på toppen ved økt NaOH-konsentrasjon, slik figur 21 viser. Samtidig viser figur 22 at ved høyere NaOH-konsentrasjon ble toppens bredde smalere. Til slutt viser figur 23 at arealet økte ved økt NaOH-konsentrasjon.



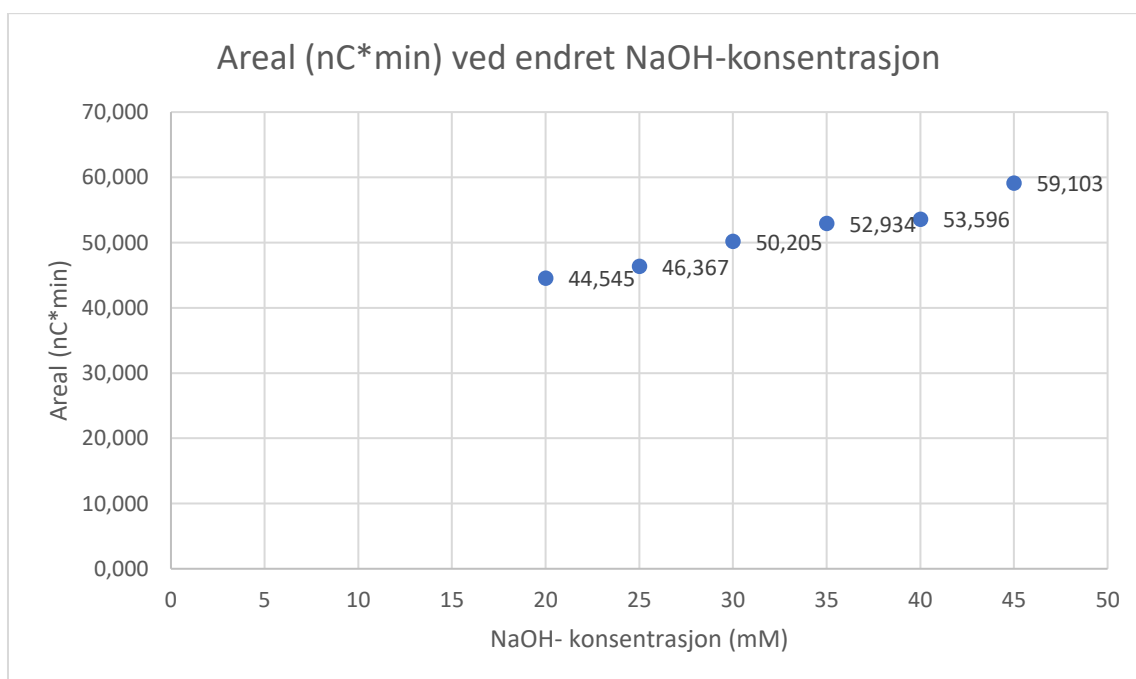
Figur 20: Retensjonstiden til toppen for lactulose blir kortere ved høyere NaOH-konsentrasjon. PA20-kolonnen er benyttet med temperatur på 30°C, flow-hastighet på 0,20 mL/min og varierende NaOH-konsentrasjon.



Figur 21: Høyden til toppen for lactulose øker ved økt NaOH-konsentrasjon. PA20-kolonnen er benyttet med temperatur på 30°C, flow-hastighet på 0,20 mL/min og varierende NaOH-konsentrasjon.



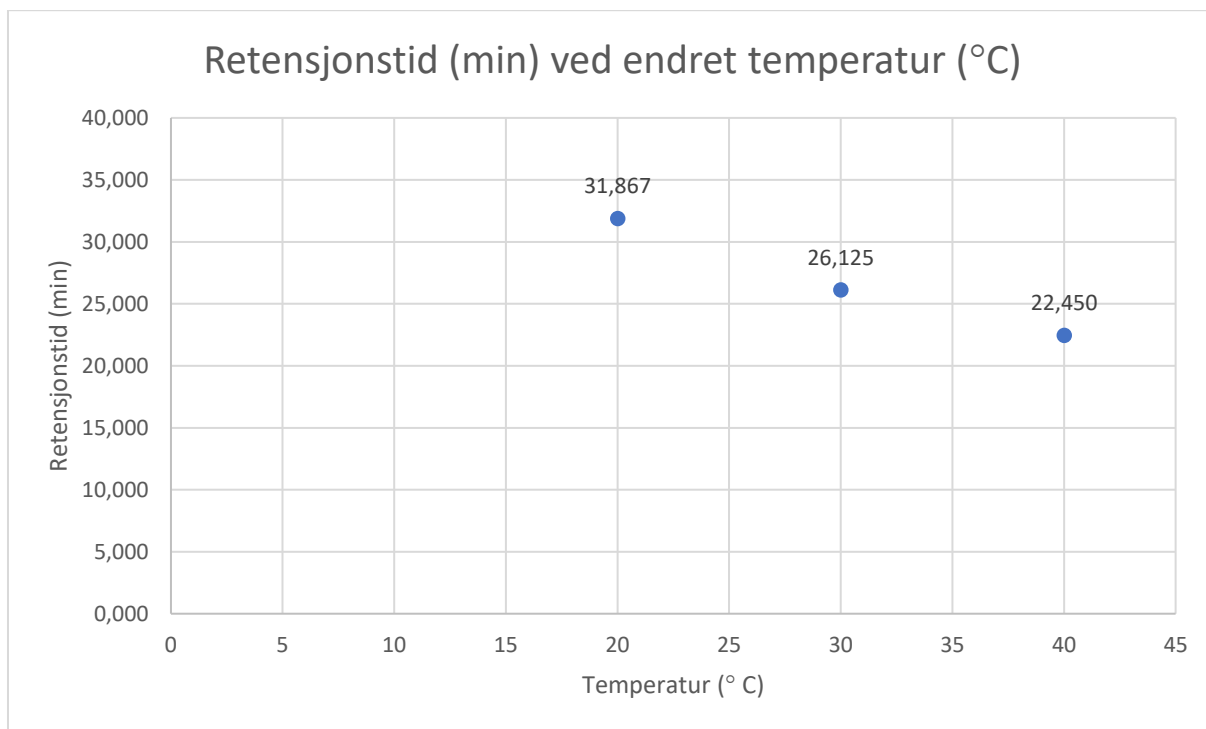
Figur 22: Bredden på toppen for lactulose minker ved økt NaOH-konsentrasjon. PA20-kolonnen er benyttet med temperatur på 30°C, flow-hastighet på 0,20 mL/min og varierende NaOH-konsentrasjon.



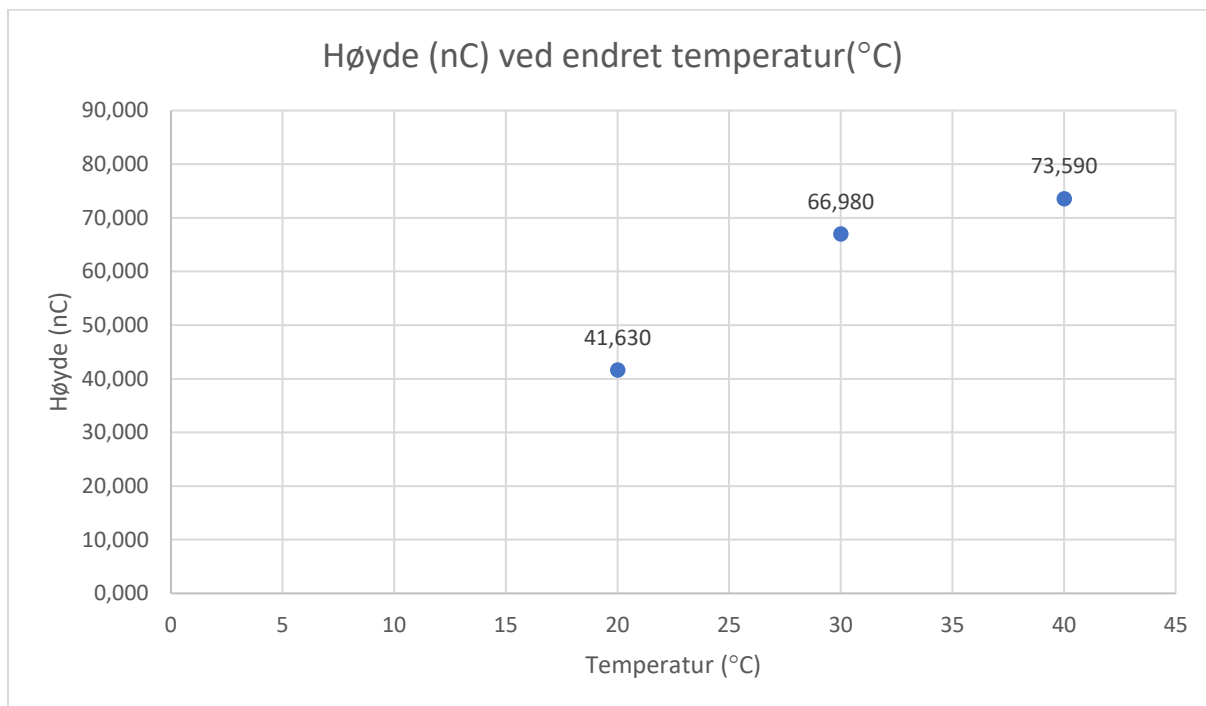
Figur 23: Areal til toppen for lactulose øker ved økt NaOH-konsentrasjon. PA20-kolonnen er benyttet med temperatur på 30°C, flow-hastighet på 0,20 mL/min og varierende NaOH-konsentrasjon.

3.3.3 Ved analyse av lactulose med HPAE-PAD og PA20-kolonnen fører økt temperatur til kortere retensjonstid, og topper med økt høyde, smalere bredde og større areal

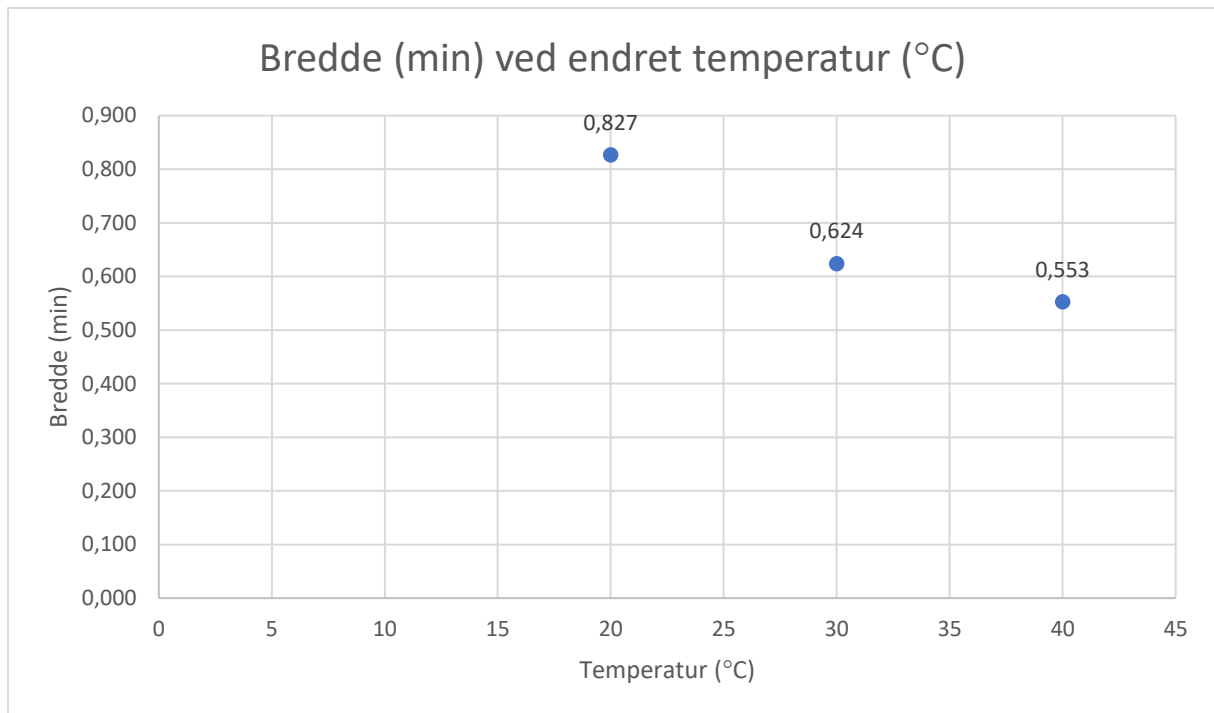
Det ble gjort forsøk med varierende temperatur i kolonnen, for å undersøke om det ville påvirke retensjonstiden, høyde, bredde og areal til analytten. Flow-hastighet og NaOH-konsentrasjonen ble holdt konstant på henholdsvis 0,20 mL/min 30 mM. Utprøvingene ble utført med en løsning på 3,33 mM lactulose i vann. De målte verdier fra analyse av sukkerløsningen med varierende temperatur er presentert i tabell 5.3, i vedlegg 5. Figur 24 viser at retensjonstiden for toppen sank med økt temperatur. I tillegg viser figur 25 at toppen for lactulose ble høyere ved økende temperatur. Toppen for lactulose ble også smalere ved økt temperatur, slik figur 26 viser. Figur 27 viser at arealet økte med økt temperatur.



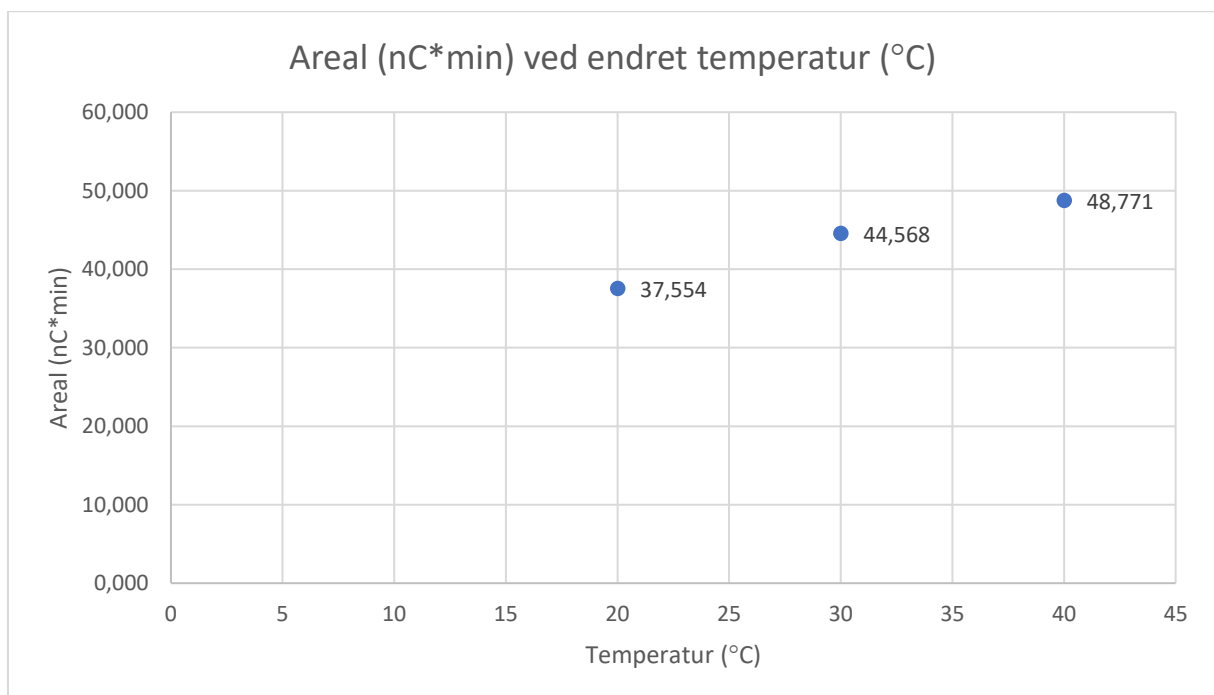
Figur 24: Retensjonstiden til toppen for lactulose blir kortere ved høyere temperatur. PA20-kolonnen er benyttet med flow-hastighet på 0,20 mL/min og NaOH-konsentrasjon på 30 mM, med varierende temperatur.



Figur 25: Høyden til toppen for lactulose øker ved økt temperatur. PA20-kolonnen er benyttet med flow-hastighet på 0,20 mL/min og NaOH-konsentrasjon på 30 mM, med varierende temperatur.



Figur 26: Bredden til toppen for lactulose minker ved økt temperatur. PA20-kolonnen er benyttet med flow-hastighet på 0,20 mL/min og NaOH-konsentrasjon på 30 mM, med varierende temperatur.



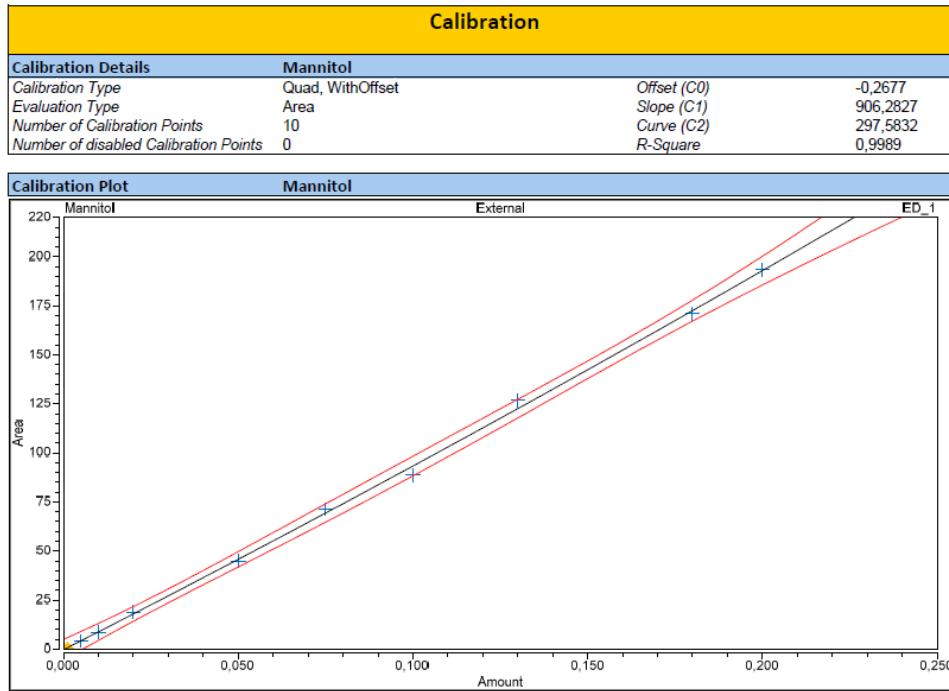
Figur 27: Areal til toppen for lactulose øker noe ved økt temperatur. PA20-kolonnen er benyttet med flow-hastighet på 0,20 mL/min og NaOH-konsentrasjon på 30 mM, med varierende temperatur.

3.4 Areal av topp benyttes for å bestemme konsentrasjon av mannitol og xylose ved analyse med HPAE-PAD og MA1-kolonne

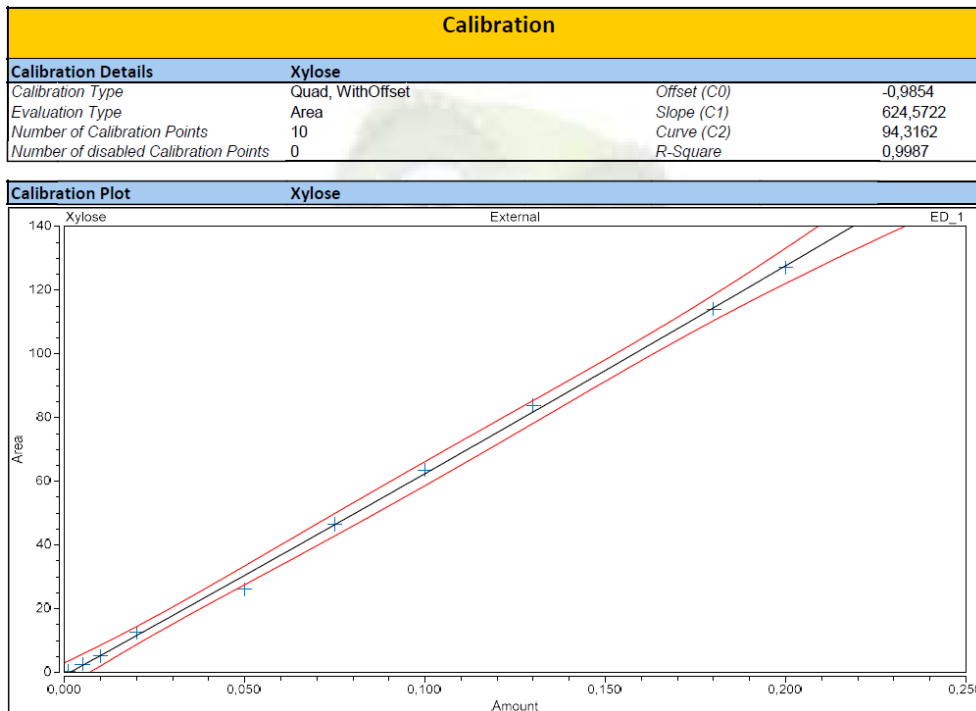
For å etablere en kalibreringskurve for mannitol og xylose ble sukkerløsninger i seks konsentrasjonsnivåer (0,1 mM, 0,05 mM, 0,01 mM, 0,005 mM, 0,001 mM og 0,0005 mM) analysert med MA1-kolonnen. Figur 6.1 til 6.4 i vedlegg 6 viser korrelasjon mellom konsentrasjon av sukkerartene og henholdsvis topphøyde og areal, samt determinasjonskoeffisient (R^2) og funksjonen til kurven. Kurvene er kvadratiske funksjoner.

Figurene viser en R^2 på 1 for korrelasjonen mellom konsentrasjon av mannitol for både topphøyde og areal. For xylose ble R^2 tilnærmet lik 1 for begge verdiene. Ved analysing av sukkerblandingen på 0,0005 mM ble ikke xylose detektert, og deteksjonsgrensen settes derfor til 0,001 mM. Det ble videre bestemt at det skulle legges til 5 flere standarder, da det var store intervaller mellom nivåene 0,01 mM og 0,05 mM og 0,10 mM, i tillegg til at det var ønskelig med et større måleområde opp til 0,20 mM for å kunne sikre god deteksjon ved høyere konsentrasjon av sukkerartene. Løsninger med konsentrasjon 0,20 mM, 0,075 mM, 0,02 mM, 0,113 mM og 0,118 mM ble analysert. Vedlegg 7 viser areal og høyde for alle løsningene i den utvidede kalibreringskurven. Figur 6.5 til 6.8 i vedlegg 6 viser korrelasjonen mellom konsentrasjonen av hvert sukker og henholdsvis topphøyde og areal, samt R^2 og funksjonen til kurven etter de nye nivåene ble lagt til. Disse kurvene er også kvadratiske funksjoner.

Figur 28 og 29 viser de endelige kalibreringskurvene for henholdsvis mannitol og xylose, med 10 konsentrasjonsnivåer fra 0,001 mM til 0,20 mM. R^2 ble beregnet til henholdsvis 0,9989 og 0,9987.



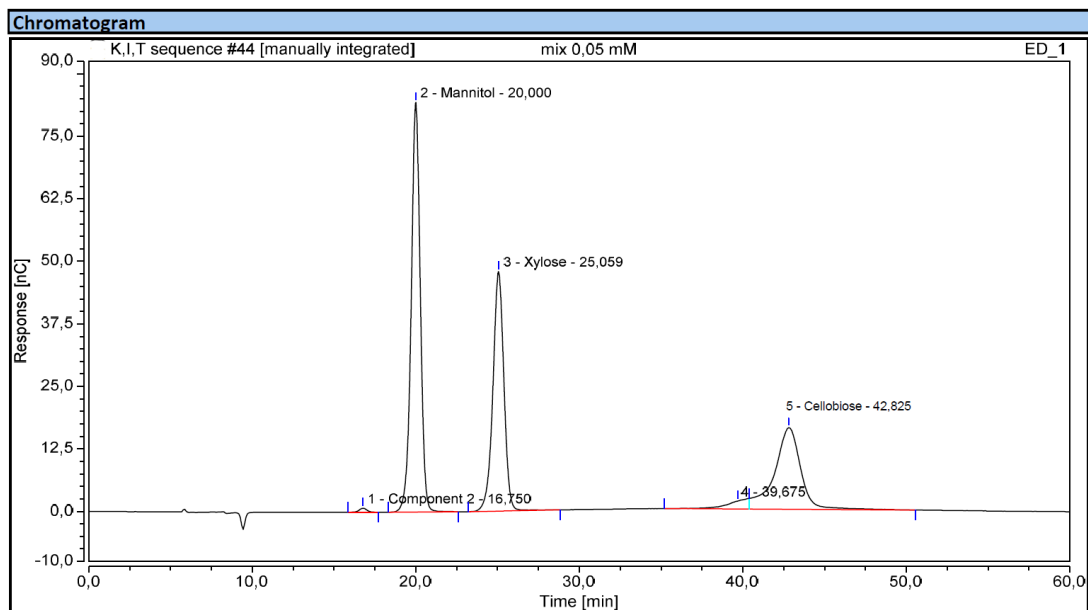
Figur 28: Kalibreringskurve for mannitol med 10 konsentrasjonsnivåer. Konsentrasjon (amount) er på x-aksen og areal er på y-aksen. R^2 ble beregnet til 0,9989.



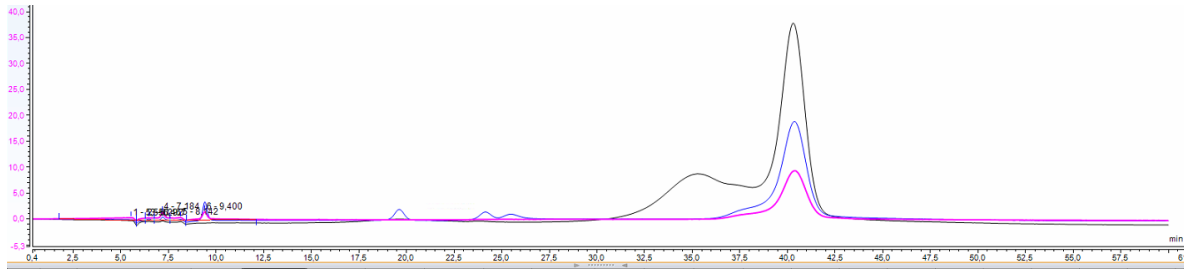
Figur 29: Kalibreringskurve for xylose med 10 konsentrasjonsnivåer. Konsentrasjon (amount) er på x-aksen og areal er på y-aksen. R^2 ble beregnet til 0,9987.

3.5 Ingen utprøvd intern standard er egnet til analyse av sukkerarter med HPAE-PAD, og human urinprøve er egnet som daglig kontroll

For å vurdere om cellobiose kunne være en god intern standard i analysen, ble en løsning med 0,05 mM mannitol, xylose og cellobiose analysert med samme betingelser som pasientprøvene. Kromatogrammet i figur 30 viser resultatet av analysen, signalet for cellobiose er topp nummer tre fra venstre og har en retensjonstid på 42,93 minutter. Det ble i tillegg analysert tre løsninger med ulike konsentrasjoner på henholdsvis 0,10 mM, 0,05 mM og 0,025 mM cellobiose. Resultatene er fremstilt i samme kromatogram i figur 31. Toppen for cellobiose har «fronting» som en kan se blir mer markant jo høyere konsentrasjonen av cellobiose er. Det ble også analysert pasientprøver med høy og lav diurese, og det var ingen funn av andre komponenter med samme retensjonstid som cellobiose.

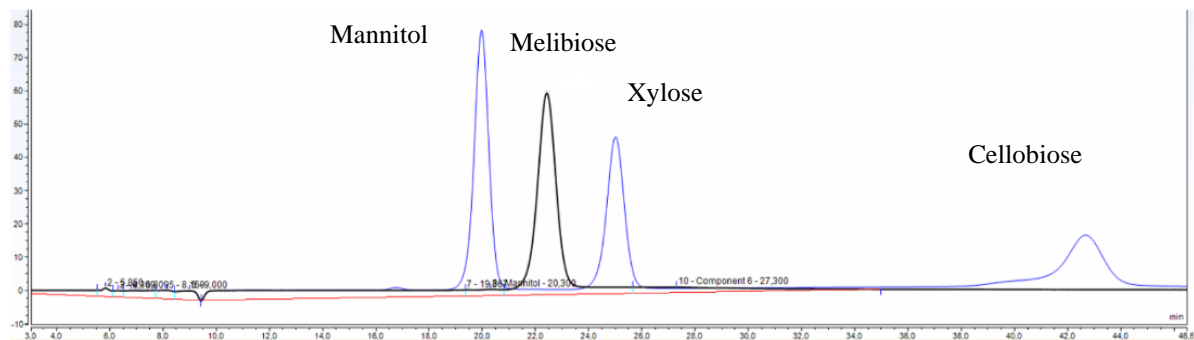


Figur 30: Kromatogrammet fra en analyse av løsning med 0,05 mM mannitol, xylose og cellobiose. Cellobiose er topp nummer tre, og elueres ved 42,925 minutter. MA1-kolonnen ble benyttet med en flow-hastighet 0,4mL/min, NaOH-konsentrasjon og temperatur på 30 °C.



Figur 31: kromatogrammet av cellobiose analysert med konsentrasjon 0,10mM (svart kurve), 0,05 mM (blå kurve) og 0,025 mM (rosa kurve). MA1-kolonnen ble benyttet med flow-hastighet 0,4 mL/min, NaOH- konsentrasjon 480mM og temperatur på 30 °C.

Videre ble en løsning med 0,05mM melibiose analysert, for å vurdere om denne egnet seg som intern standard. Figur 32 viser toppen til melibiose presentert i samme kromatogram som resultatet av en løsning med 0,05mM mannitol og xylose. Melibiose har en retensjonstid på 22,43 minutter. Toppen ligger mellom mannitol og xylose, og har en høy og smal form. Det ble i motsetning til cellobiose observert andre komponenter i pasientprøvene med samme retensjonstid som melibiose.



Figur 32: Kromatogram fra en analyse av mannitol, melibiose og xylose med konsentrasjon 0,05mM. Helt til høyre i kromatogrammet ligger cellobiose. MA1-kolonnen ble benyttet med flow-hastighet 0,4 mL/min, NaOH- konsentrasjon 480mM og temperatur på 30 °C.

For å vurdere om syntetisk kontrollmateriale eller en reel pasientprøve (human kontroll) kunne være godt egnet til å måle presisjon og riktighet, ble kontrollmaterialene analysert som daglig kontroll over en periode på henholdsvis 3 og 6 dager. For å beregne presisjonen av metoden ble SD og CV beregnet, som tabell 11 og 12 viser. Konsentrasjonen av mannitol og xylose som ble målt for det syntetiske kontrollmaterialet over en periode på 3 dager, er presentert i kontrollkort i vedlegg 8.

Tabell 11: Oversikt over detektert konsentrasjon av mannitol og xylose i den syntetiske kontrollen i løpet av 3 dager, samt beregninger gjort for å vurdere presisjon.

	Mannitol	Xylose
Konsentrasjon, dag 1 (mM)	0,0991	0,0955
Konsentrasjon, dag 2 (mM)	0,0981	0,1005
Konsentrasjon, dag 3 (mM)	0,0957	0,0966
Gjennomsnitt (X_{mid})	0,0976 mM	0,0985 mM
Standardavvik (SD)	0,0017 mM	0,0027 mM
Variasjonskoeffisienten (%CV)	1,8 %	2,7 %

Tabell 12: Oversikt over detektert konsentrasjon av mannitol og xylose i den humane kontrollen i løpet av 6 dager, samt beregninger gjort for å vurdere presisjon.

	Mannitol	Xylose
Konsentrasjon, dag 1 (mM)	0,0031	0,0697
Konsentrasjon, dag 2 (mM)	0,0028	0,0649
Konsentrasjon, dag 3 (mM)	0,0030	0,0700
Konsentrasjon, dag 4 (mM)	0,0030	0,0705
Konsentrasjon, dag 5 (mM)	0,0029	0,0707
Konsentrasjon, dag 6 (mM)	0,0033	0,0796
Gjennomsnitt (X_{mid})	0,00300 mM	0,0709 mM
Standardavvik (SD)	$1,7 \cdot 10^{-4}$ mM	$4,8 \cdot 10^{-3}$ mM
Variasjonskoeffisienten (%CV)	5,7%	6,7%

3.6 Ulik diurese hos pasientene krever ulik fortynningsgrad av urinprøvene

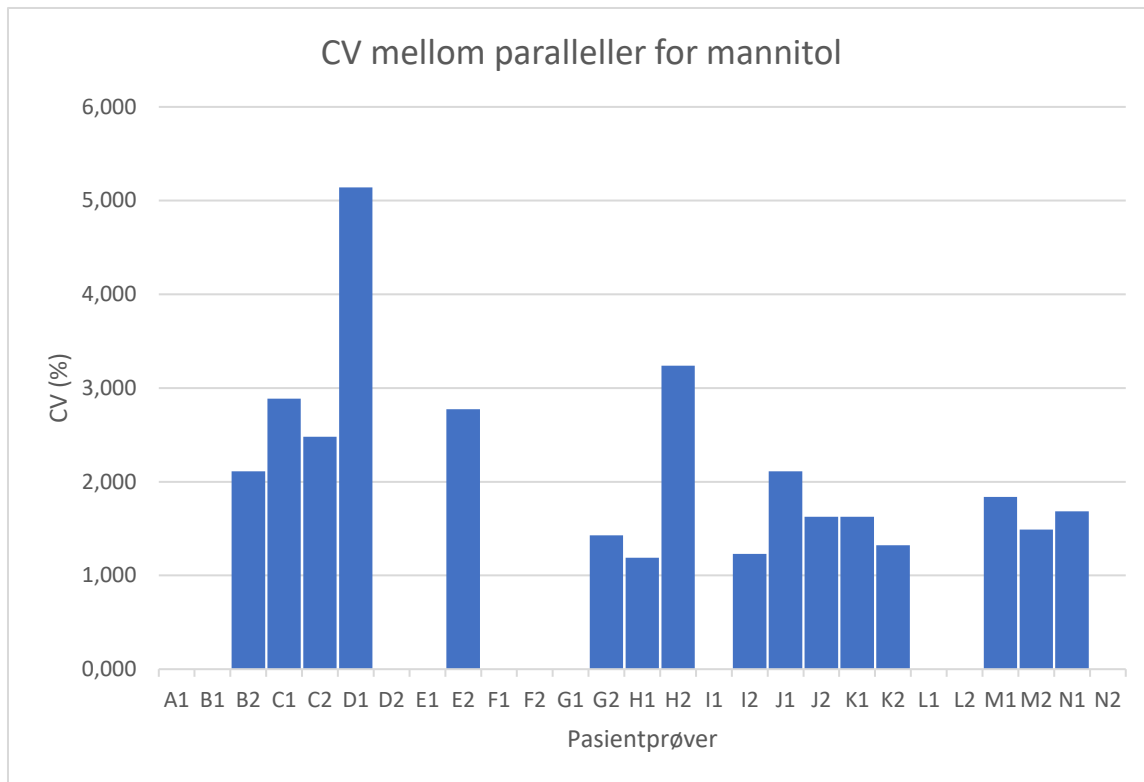
Det var ønskelig å undersøke hvilken fortynningsgrad av urinprøvene som ga den mest optimale deteksjonen av mannitol og xylose på MA1-kolonnen. Én pasientprøve ble derfor fortynnet 1:500 og 1:1000 og resultatene er presentert i tabell 13.

Tabell 13: Detektert konsentrasjon av mannitol og xylose i en pasientprøve ved fortynningsgrad 1:500 og 1:1000.

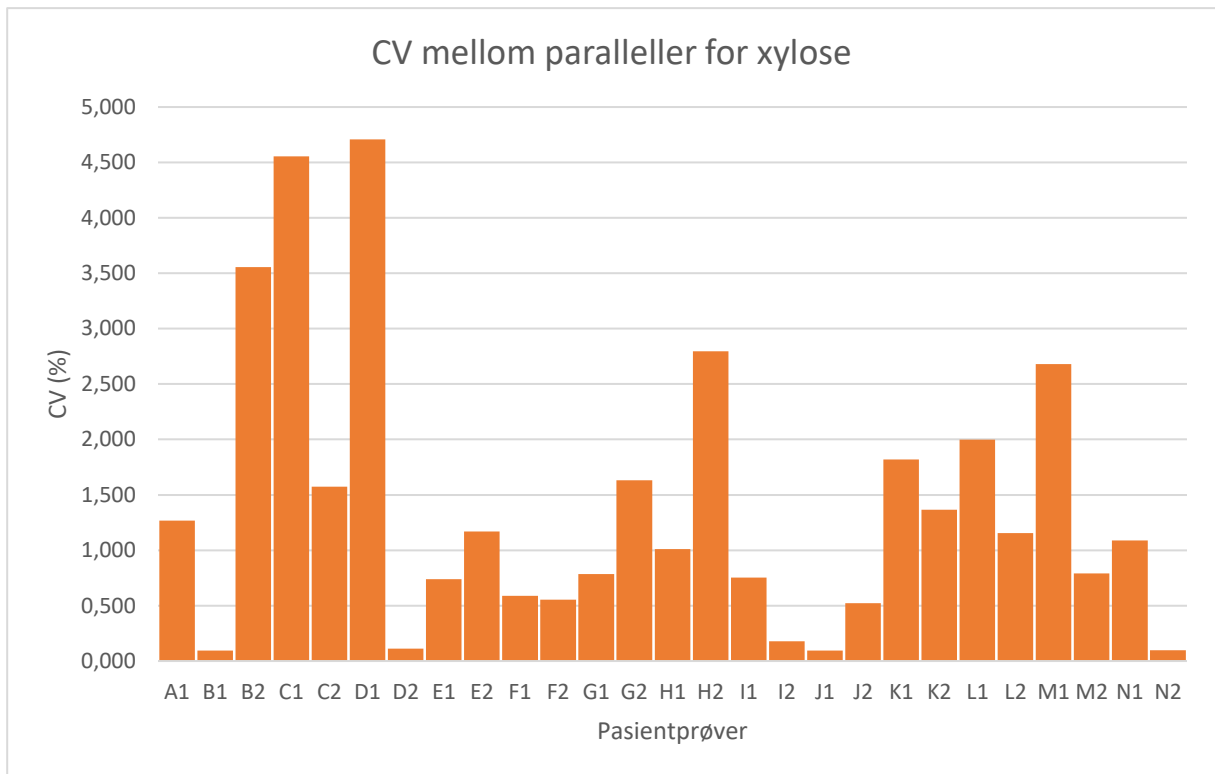
Fortynningsgrad	Konsentrasjon av mannitol (mM)	Konsentrasjon av xylose (mM)
1:500	0,0032	0,0865
1:1000	0,0020	0,0403

3.7 Validering av analysemetoden for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD viser at det er liten variasjon mellom parallellene, og at metoden har god recovery av analyttene

For å undersøke om det er behov for å analysere paralleller av pasientprøvene eller ikke, ble SD og CV for konsentrasjon av mannitol og xylose mellom parallellene til 28 pasientprøver beregnet (A–N). Det ble analysert både baseline- og FU-urinprøver for hver pasient. Beregnet CV mellom baselineparallellene angis med «1», og beregnet CV mellom FU-parallellene angis med «2». For den første pasientprøven som ble analysert var CV mellom parallellene ved baseline (A2) på 7,0% og 19,6 % for henholdsvis mannitol og xylose. For de resterende pasientprøvene hadde parallellene en CV på 5,1 % og nedover. Dersom en fjerner den nevnte parallellen med høyest CV fra beregningen er gjennomsnittlig CV på henholdsvis 1,3% og 1,4%. Diagrammene i figur 33 og 34 fremstiller variasjonen i CV mellom paralleller fra pasientprøvene til mannitol og xylose. Parallell A2 er ekskludert. Beregning av CV mellom parallellene vises i vedlegg 9.



Figur 33: Diagram viser beregnet CV for konsentrasjon av mannitol mellom parallellene av pasientprøvene A- N. Figur 33: Diagram som viser beregnet CV for konsentrasjon av mannitol mellom parallellene av pasientprøvene A- N. Pasientprøvene inkluderer både baselineprøver og follow-up-prøver. Parallell A2 hadde en CV på 19,6%, og er ekskludert fra søylediagrammet. Parallell D1 har da den høyeste CV med 5,1%. Parallellene som ikke har noen høyde i diagrammet, har en CV på 0%.



Figur 34: Diagram viser beregnet CV for konsentrasjon av xylose mellom parallellene av pasientprøvene A- N. Figur 34: Diagram som viser beregnet CV for konsentrasjon av xylose mellom parallellene av pasientprøvene A- N. Figur 34: Histogram som viser beregnet CV for konsentrasjon av xylose mellom parallellene av pasientprøvene A- N. Pasientprøvene inkluderer både baselineprøver og follow-up-prøver Parallell A2 hadde en CV på 7,0%, og er ekskludert fra diagrammet. Parallell D1 har da den høyeste CV med 4,7%.

For å validere hvor god metoden er til å detektere mannitol og xylose i urin ble recovery, altså grad av gjenfunnet analytt, beregnet. Tre replikater av samme pasientprøve, ved fortynningsgrad 1:100 og 1:1000 ble analysert, og resultatene fra analysering vises i vedlegg 2. Tabell 14 viser beregnet recovery av mannitol og xylose for hver replikat, ved fortynningsgrad 1:100 og 1:1000. Gjennomsnittlig recovery for mannitol ved fortynning 1:100 ble 99,60%, og 98,89% ved fortynning 1:1000. For xylose ble gjennomsnittlig recovery 99,21% ved fortynning 1:100 og 98,89% ved fortynning 1:1000.

Tabell 14: Oversikt over gjenfunnet mannitol og xylose (%) i tre replikater av samme pasientprøve med kjent konsentrasjon både ved fortynningsgrad 1:100 og 1:1000, samt gjennomsnittet for tre de analyserte replikatene.

Replikat	Gjenfunnet mannitol (%) i prøven		Gjenfunnet xylose (%) i prøven	
	Fortynnet 1:100	Fortynnet 1:1000	Fortynnet 1:100	Fortynnet 1:1000
1	99,18	98,77	98,27	98,77
2	99,92	97,98	100,79	97,98
3	99,70	99,93	98,56	99,93
Gjennomsnitt gjenfunnet (%)	99,60	98,89	99,21	98,89

3.8 Pasientprøver

3.8.1 Oversikt over pasientkarakteristikk ved baseline

Basert på pasientenes svar i spørreskjemaet «Generelle opplysninger» og «Livsstil» ved oppstart av forsøksperioden, ble tabell 15 utarbeidet. Faktorene alder, kjønn, BMI, røyke- og alkoholforbruk og utdannelsesnivå ble sammenlignet mellom gruppene, samt p-verdi for hver parameter.

Tabell 15: Oversikt over fordelingen av ulike parametere i intervensjonsgruppen (glutenfri gruppe, GF) og kontrollgruppen, samt p-verdi for forskjell mellom gruppene.

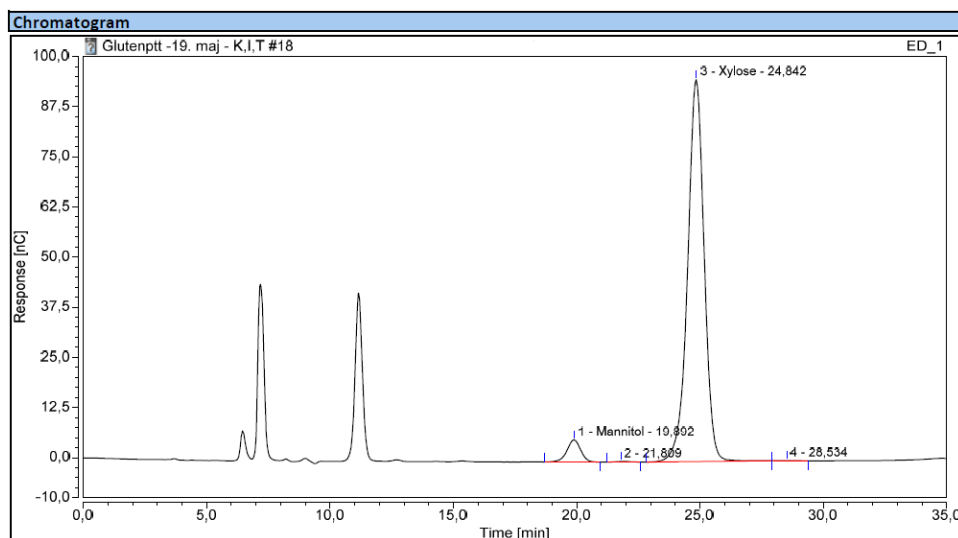
	GF n= 40	Kontroll n= 36	p-verdi
Kjønn (kvinner/menn)	33 / 7	17 / 19	0,0025
Alder, median^a (IQR)	31 (IQR: 27-39,5)	33 (IQR: 27-42)	0,7193
BMI^b, median (IQR)	23,9 (IQR: 21,9-27,6)	25,5 (IQR: 21,9-27,9)	0,4696
Undervekt (< 18,5)	0	1	0,4982
Normalvekt (18,5-24,9)	25	15	0,1805
Overvekt (25,0-29,9)	7	12	0,2019
Fedme (>30)	8	8	0,4982
Røyker^c			
Daglig	5	15	0,0043
Sjeldnere	4	1	0,4351
Røyker ikke	31	20	0,0489
Alkoholenheter per uke			
Ingen	10	10	0,5430
1 til 14	30	24	0,5359
> 14	0	2	0,2436
Høyere utdanning^d	30	19	0,0608

a: Ettersom aldersfordelingen i de to gruppene ikke var normalfordelt ble det beregnet median og interkvartal range (IQR). *b:* BMI ble beregnet slik FHI anbefaler («Kroppsmasseindeks (KMI / BMI) og helse», 2015) *c:* Ved spørsmål om røykevaner omfatter kategorien “Daglig” deltakerne som har svart “Ja, daglig”, kategorien “Sjeldnere” omfatter deltakerne som har svart “Ja, minst en gang om ugen”, “Ja, minst en gang om måneden, men ikke hver uge” eller “Ja, sjeldnere end en gang om måneden”, og kategorien “Røykere ikke” omfatter deltakerne som har svart “Nej, jeg er holdt op” eller “Nej, jeg har aldrig røget”. *d:* Ved spørsmål om utdanningsnivå omfatter kategorien “Høyere utdanning” deltakerne som har svar “Kort videregående utdanning (<3 år)”, “Mellemlang videregående utdanning (3-4 år)” eller “Lang videregående utdanning (>4 år)”, og kategorien “Lavere

utdannelse” omfatter deltakerne som har svar “Grundskole”, “Gymnasial utdannelse” eller “Erhvervsfaglig utdannelse”.

3.8.2 Ingen signifikant forskjell i masse mannitol og xylose for pasientene i intervensjonsgruppen og kontrollgruppen, samt mellom baseline og follow-up innad i gruppene

For å undersøke hvor god metoden er til å detektere mannitol og xylose i urinen, ble 14 pasienters urinprøve, en ved baseline og en ved FU, analysert. Prøver fra 8 pasienter i intervensjonsgruppen og 6 prøver fra pasienter i kontrollgruppen, ble analysert etter prosedyren i vedlegg 1. Figur 35 viser kromatogrammet til en urinprøve fra en pasient analysert etter prosedyren.



Figur 35: Kromatogram av urinprøve fra pasient fortyntet 1:500 analysert på MA1-kolonnen etter prosedyren i vedlegg 1. MA1-kolonnen ble benyttet med flow-hastighet 0,4 mL/min, NaOH-konsentrasjon 480mM og temperatur på 30 °C.

Det ble analysert to paralleller av hver urinprøve, deretter ble SD, CV og masse (g) beregnet ved å bruke gjennomsnittet av to parallellene. Resultatet er vist i vedlegg 9. Tabell 16 viser median for masse av sukkerartene ved baseline og FU for intervensjonsgruppen og kontrollgruppen. Median av masse for mannitol i urinen for pasientene i intervensjonsgruppen ved baseline ble funnet til å være 0,241 g, og ved FU ble median 0,269 g. For kontrollgruppen ble median masse for mannitol ved baseline funnet til å være 0,215 g, og 0,270 g ved FU. For xylose ble median masse detektert i urinen ved baseline og FU for intervensjonsgruppen henholdsvis 6,198 g og 5,588 g, og for kontrollgruppen ved baseline og FU henholdsvis 5,407

g og 5,904 g. Det ble også beregnet en p-verdi på $>0,05$ for masse mannitol og xylose detektert hos pasientene i intervensjonsgruppen sammenlignet med kontrollgruppen. I tillegg ble p-verdi for masse av mannitol og xylose innad i gruppene ved baseline og FU beregnet til $>0,05$, slik tabell 17 viser.

Disse statistiske beregningene viser at det ikke er en signifikant forskjell mellom gruppene, verken ved baseline eller FU. Heller ikke er det en signifikant forskjell innad i gruppene ved baseline og FU.

Tabell 16: Oversikt over utskilt masse (g) mannitol og xylose i urin for intervensjonsgruppen og kontrollgruppen. Det er beregnet median og IQR, samt p-verdi som viser forskjellen mellom den intervensjonsgruppen (glutenfri gruppe) og kontrollgruppen.

	Glutenfri gruppe	Kontrollgruppe	p-verdi
Median (IQR) for masse (g) av mannitol ved baseline (IQR)	0,241 (0,214-0,342)	0,215 (0,191-0,318)	0,662
Median (IQR) for masse (g) av mannitol ved FU (IQR)	0,269 (0,233-0,312)	0,270 (0,196-0,323)	0,7546
Median (IQR) for masse (g) av xylose ved baseline (IQR)	6,198 (4,590-6,637)	5,407 (3,960-6,162)	0,662
Median (IQR) for masse (g) av xylose ved FU (IQR)	5,588 (5,051-6,575)	5,904 (5,192-6,386)	0,9497

Tabell 17: Beregnet p-verdi for forskjellen i masse mannitol og xylose utskilt i urinen ved baseline og follow-up, for pasientene i intervensjonsgruppen (glutenfrie gruppen) og kontrollgruppen.

	p-verdi
Glutenfri: BL sammenlignet med FU for mannitol	0,9717
Glutenfri: BL sammenlignet med FU for xylose	0,6492
Kontroll: BL sammenlignet med FU for mannitol	0,3014
Kontroll: BL sammenlignet med FU for xylose	0,2011

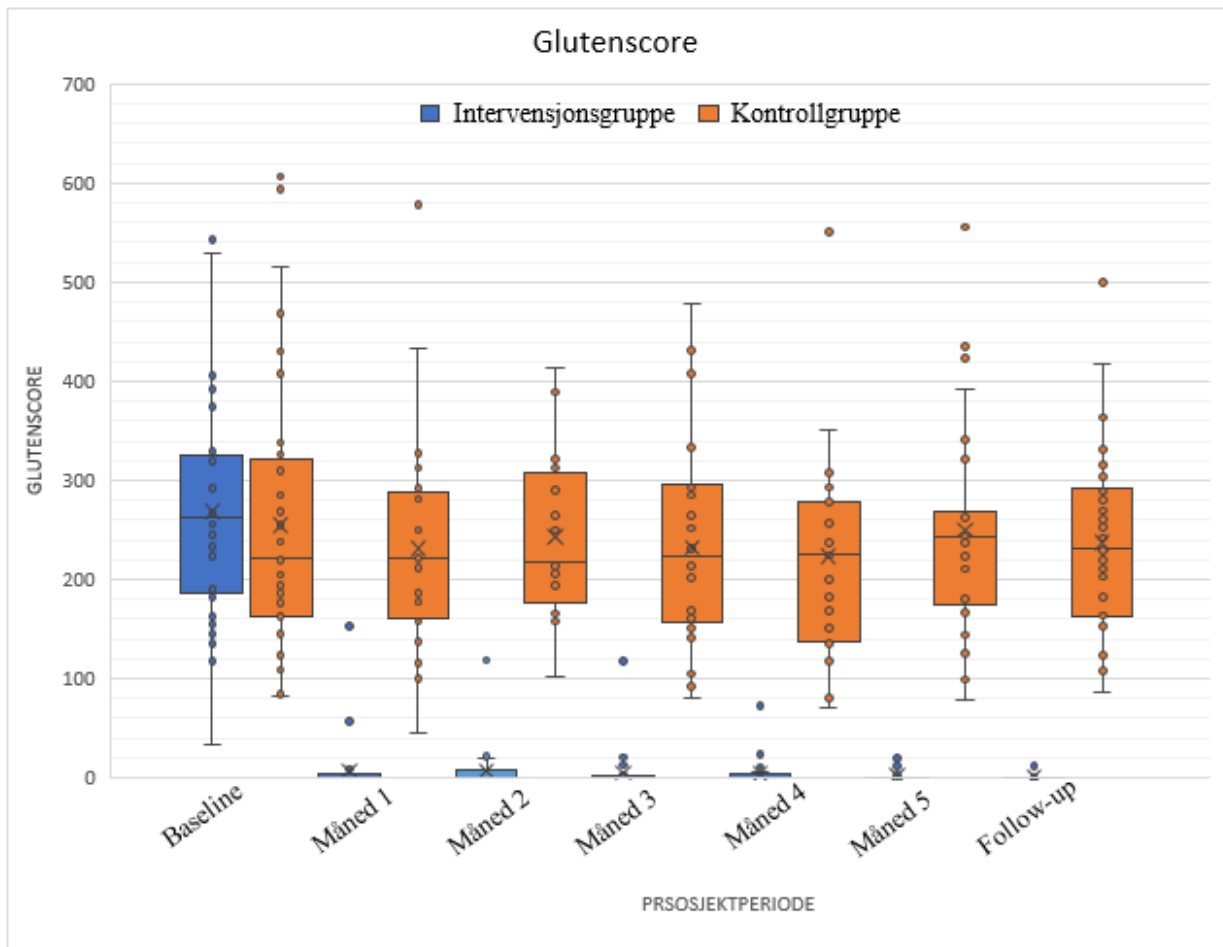
3.8.3 Beregnet glutenscore for pasienter i intervensjonsgruppen og kontrollgruppen

Matvarenes gluteninnhold (g), samt hyppigheten av pasientenes inntak av matvarene, ble brukt for å beregne glutenscore for hver pasient. En oversikt over beregnet gluteninnhold per porsjon av matvarene som er loggført i FFQ er vist i tabell 18, og vedlegg 3 viser utregningen.

Tabell 18: Oversikt over beregnet gluteninnhold (g) pr porsjon av hver matvaregruppe i prosjektets spørreskjema. Verdiene er beregnet ut ifra standardiserte porsjonsstørrelser og tilgjengelig informasjon om gluteninnhold i ulike matvarer.

Matvare	Mengde gluten (g) pr porsjon
Soyasaus	0,01
Leverpostei og paté	0,05
Matfløte	0,08
Wienerpølse	0,08
Sprøstekt løk	0,09
Saus jevnet med mel	0,23
Sjokolade med kjeks (Kit Kat)	0,33
Øl	0,50
Kake	1,20
Wienerbrød	1,54
Kjeks	1,56
Frokostblanding (Havrefras, Rugfras, Cheerios, Cornflakes)	1,61
Panering (rasp)	1,71
Vafler	2,39
Grøt (m hvete, bygg eller rug)	2,76
Rugbrød	2,98
Bulgur, couscous, perlespelt, perlebygg, perlerug	3,46
Ferdige middagsretter (m gluten)	4,19
Bolle	4,82
Pizza, burger og pitabrød	4,86
Franskbrød	5,63
Pasta og nudler (ikke risnudler)	6,00

Resultatene av glutenscoren for intervensjonsgruppen og kontrollgruppen ble prosessert i Excel. For å visualisere resultatene ble det laget et boksplott, som er vist i figur 36. Diagrammet viser tidspunkter fra «Baseline» til «Follow-Up» langs x-aksen, og glutenscore langs y-aksen. En oversikt over medianen og interkvartilintervallet (Q1 til Q3) for intervensjonsgruppen og kontrollgruppen er fremstilt i tabell 19.



Figur 36: Boksplottet visualiserer median og spredning av glutenscoren for intervensjonsgruppen (blå) og kontrollgruppen (oransje). Langs x-aksen er prosjektperiodens varighet fra baseline til follow-up, og langt y-aksen er glutenscoren for samtlige pasienter.

Tabell 19: Oversikt over intervensjonsgruppens og kontrollgruppens median og IQR for glutenscore, ved hver måned i prosjektperioden.

	Baseline	Måned 1	Måned 2	Måned 3	Måned 4	Måned 5	Follow-up
Intervensjons- gruppe Median (IQR)	262,0 (190,9- 322,3)	0,18 (0,0- 3,2)	0,02(0,0- 6,6)	0,0 (0,0- 0,80)	0,0 (0,0- 2,5)	0,0 (0,0- 0,51)	0,0 (0,0- 0,02)
Kontroll- gruppe Median (IQR)	221,96 (165,7 – 314,4)	222,04 (163,0- 285,8)	217,6 (188,1 – 294,0, 8)	223,0 (159,- 294,0)	224,6 (144,5 – 271,3)	243,8 (178,4- 267,0)	224,3 (162,1- 292,8)

4.0 Diskusjon

Hovedformålet med dette prosjektet var å etablere en metode for sikker deteksjon av sukkerartene mannitol, xylose og lactulose i prosjektdeltakernes urin med HPAE-PAD. I tillegg skulle en liten gruppe pasientprøver analyseres, for å vurdere om metoden som ble etablert er god nok til å analysere resten av pasientprøvene. Den etablerte metoden skal benyttes i et større forskningsprosjekt, som sammenligner tarmpermeabilitet og gluteninnhold i kosten hos pasienter i tidlige stadier av en MS-sykdom. Dette prosjektet gjennomføres for å vurdere om en glutenholdig diett kan være en faktor som bidrar til utvikling eller forverring av MS-sykdom.

4.1 Forskning på multippel sklerose

For at et intervensjonsprosjekt om multippel sklerose skal være interessant, er det viktig å studere en stor og representativ gruppe pasienter, slik at resultatene også gjelder for resten av MS-populasjonen. Slik det kom frem i flytskjemaet i figur 7, er det 40 deltakere fra intervensjonsgruppen og 36 deltakere fra kontrollgruppen som gjennomførte sukkertest ved FU. Ifølge forfatteren av «Practical Statistics for Medical Research» er det nødvendig med minst 50 deltakere i et forskningsprosjekt med FFQ's for å kunne gjøre gode statistiske beregninger, men 100 eller flere deltakere er ønskelig (Cade et al., 2002) (Altman, 1990). Det er derfor mulig å gjennomføre gode statistiske beregninger med denne populasjonen, selv om det ideelt sett kunne vært flere.

I flytskjemaet kom det også frem at antall pasienter i intervensjonsgruppen og kontrollgruppen er jevnt fordelt. Det var en marginal forskjell, med to flere deltagere i kontrollgruppen ved oppstart av prosjektet, og fire flere deltagere i intervensjonsgruppen ved slutten av prosjektet. Det var totalt 20 forskningsobjekter som droppet ut i tidsperioden fra prosjektets start til prosjektets slutt. Grunnet personlige årsaker var det sju deltakere som droppet ut før de fordelte seg i grupper, og senere var det tre deltakere fra intervensjonsgruppen og syv deltakere fra kontrollgruppen som droppet ut. To deltakere i kontrollgruppen droppet ut grunnet restriksjoner under corona-pandemien, og én grunnet sykdom.

Etter at deltakerne fordelte seg i intervensjonsgruppe og kontrollgruppe, var det et flertall fra den sistnevnte gruppen som droppet ut. Dette tyder på at det ikke var den glutenfrie dietten som har vært årsaken til det største frafallet, som en kanskje kunne forvente. Det å følge en glutenfri diett kan være en livsstilsendring som påvirker hverdagen i stor grad. Ettersom det kreves en større innsats fra intervensjonsgruppen, ble disse deltakerne trolig oftere påminnet om at de var en del av studien, og var av den grunn antagelig mer innstilte på å fullføre. Det er også mulig at deltakerne i kontrollgruppen valgte å ikke gå på glutenfri diett fordi de var mindre interesserte i prosjektet fra begynnelsen, og at det derfor var flere fra denne gruppen som droppet ut.

I tillegg til de som droppet ut var det totalt syv deltakere som ble ekskludert fra studien av ulike grunner. Da pasientene fikk tilbud om å ta del i studien hadde de fått påvist synsnervebetennelse, som i mange tilfeller er det første symptomet på MS (Dalbro & Kerty, 2019). Pasientene ble rekruttert på et så tidlig tidspunkt for å være sikker på at de ikke hadde startet medisinsk behandling før de deltok i studien. Likevel var det ikke alle med synsnervebetennelse som utviklet MS. Det var i tillegg to tilfeller der det viste seg at deres synsrelaterte problemer skyldtes andre sykdommer i øyet, og de ble av den grunn ekskludert. En pasient ble også ekskludert grunnet graviditet. Under graviditet skilles det ut hormoner, spesielt østrogen og progesteron, som har vist seg å påvirke tarmfunksjonen og metabolismen (Edwards et al., 2017). I tillegg påvirker graviditet immunsystemet, og kvinner under graviditet er delvis beskyttet mot MS-relatert sykdomsaktivitet (Whitacre et al., 1999). Gravide kunne derfor ikke delta i studien da det ville vært usikkert om endringer i tarmpermeabiliteten faktisk er grunnet et glutenfritt kosthold eller noe annet.

For å kunne sammenligne med den øvrige befolkningen, er det i slike forskningsprosjekter nødvendig med friske kontrollpersoner. I forskningsprosjektet denne oppgaven er en del av, er også urinprøver fra friske kontrollpersoner analysert, men i denne oppgaven er kun MS-pasienter inkludert.

4.1.2 Vurdering av pasientkarakteristika ved baseline

Parameterne som vurderes i tabell 15 ble valgt ut fordi de kan gi et godt bilde på hva slags mennesker som er i intervensjonsgruppen og kontrollgruppen, samt å vurdere bias og hvorvidt disse resultatene kan gjelde for en større gruppe pasienter. Fordelingen av pasienter i gruppene er ikke randomisert, og det er derfor viktig å vurdere om dette kan ha en påvirkning på resultatene (Cade et al., 2002). Kjønn var spesielt interessant å vurdere av flere årsaker. I en studie gjort av Edogawa et al., kommer det frem at friske kvinner har lavere utskillelse av lactulose i urinen enn friske menn etter fullført sukkertest ($p=0,009$). Dette reflekterer en lavere tarmpermeabilitet hos kvinner enn hos menn (Edogawa et al., 2018). I tillegg er det kjent at den generelle MS-populasjonen består av et flertall kvinner (King, 2020). Slik tabellen viser utgjorde kvinnene 33 av 40 individer i intervensjonsgruppen, som tilsvarer 83%, og i kontrollgruppen var 17 av 36 individer kvinner, som tilsvarer 47%. Videre ble p-verdien beregnet til å være 0,0025, som er lavere enn signifikansnivået på 5% (0,05). Dette tilsier at det ikke er en tilfeldig fordeling av kvinner og menn i intervensjonsgruppen og kontrollgruppen. Ut ifra denne beregningen kan en påstå at flere kvinner enn menn foretrekker å delta i intervensjonsgruppen. Dette funnet er av stor betydning for databehandlingen videre i prosjektet, da en må vurdere om gruppene, på tross av den skjeve kjønnsfordelingen, er sammenlignbare. Dersom en, på bakgrunn av sukkertesten, finner ut at intervensjonsgruppen gjennomsnittlig har en mindre permeabel tarm sammenlignet med kontrollgruppen, kan en ikke nødvendigvis være sikker på om dette skyldes den glutenfrie dietten eller biologiske forskjeller mellom kvinner og menn. På bakgrunn av den signifikante forskjellen i kjønnsfordeling, vil det være gunstig å behandle resultatene oppdelt, slik at kvinner i intervensjonsgruppen sammenlignes med kvinner i kontrollgruppen, og tilsvarende for menn. “The Sex and Gender Equity in Research” (SAGER)-veilederen er et godt redskap å følge for å unngå at kjønnsbias påvirker tolkningen av resultatene (Heidari et al., 2016).

For å kunne si noe om livsstil og helse blant deltakerne i gruppene, ble parameterne BMI, alkohol- og røykevaner sammenlignet. For parameterne BMI, alder og alkoholvaner ble det ikke funnet en signifikant forskjell mellom intervensjonsgruppen og kontrollgruppen. For røykevaner ble det imidlertid funnet en signifikant forskjell mellom gruppene da det er flere av deltakerne i kontrollgruppen som røyker daglig enn deltakerne i intervensjonsgruppen ($p=0,0043$). I tillegg er det et lite flertall av deltakerne i intervensjonsgruppen i forhold til kontrollgruppen som har svart at de ikke røyker, som viser at det er en signifikant forskjell

også her ($p=0,0489$). Røyking er en svært viktig parameter å vurdere, da det viser seg at denne miljøfaktoren fører til dårligere prognose og økt sykdomsaktivitet hos MS-pasienter (Arneth, 2020) (Rosso & Chitnis, 2020). En studie av Hedström et al., der 902 MS-pasienter og 1855 kontrollpersoner deltok, ble det funnet at røykere av begge kjønn hadde økt risiko for å utvikle MS, og at risikoen økte med økt hyppighet av røyking ($p<0,0001$) (Hedström et al., 2009). Den signifikante forskjellen i røykevaner mellom intervensjonsgruppen og kontrollgruppen gjør at det må justeres for røyking ved vurdering av resultatene på samme måte som for kjønn. Blir ikke røykevaner og kjønn justert for, kan en risikere gjøre en type I feil. Dette er en feil der en konkluderer med et falskt positivt resultat. En slik feil vil være å konkludere med at en eventuell forskjell i tarmpermeabilitet mellom intervensjonsgruppen og kontrollgruppen skyldes et glutenfritt kosthold, når det egentlig er røykevaner eller kjønn som er årsaken til forskjellen (S. R. Jones et al., 2003).

Når det gjelder utdanning, er det ingen signifikant forskjell mellom intervensjonsgruppen og kontrollgruppen. Likevel er det en tendens til forskjell da det er et flertall i intervensjonsgruppen med høyere utdanning ($p=0,0608$). Utdanning kan si noe om sosioøkonomisk status, og en kan diskutere om dette påvirker valg av diett. Det å holde en diett kan være økonomisk kostbart, og glutenfrie erstatninger koster i de fleste tilfeller mer enn tilsvarende produkter med gluten (Stevens & Rashid, 2008). Det er vist at det er en sammenheng mellom sosioøkonomisk status og fysisk helse, og det bør derfor tas hensyn til dette ved behandling av resultater i denne studien (Mackenbach et al., 2008).

4.2 Sukkertest som måling av tarmpermeabilitet

Bestemmelse av L/M-ratio er en godt dokumentert metode i litteraturen for å vurdere tarmpermeabilitet, og xylose gir en indikasjon på absorpsjonsevnen i tynntarmen. (Grootjans et al., 2010) (Menzies et al., 1979). I studien som Buscarinu et al. gjennomførte i 2016, som presenteres under kapittel 1.2.2, ble L/M-ratio undersøkt for pasienter med RRMS, og sammenlignet denne ratioen med friske kontroller (Buscarinu et al., 2017). I vår oppgave utføres en lignende sukkertest, denne gangen for å se om gluten påvirker tarmpermeabiliteten. Ettersom metoden for kvantifisering av lactulose med HPAE-PAD ikke ga tilfredsstillende deteksjon, er ikke lactulose i pasientenes urin kvantifisert. Dermed er det per dags dato ikke mulig å beregne L/M-ratio hos pasientene. En velegnet metode for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonnen er imidlertid utviklet, og de nevnte sukkerartene

ble kvantifisert hos et randomisert utvalg av pasienter. Figur 35 viser kromatogrammet fra en av pasientprøvene fortynnet 1:500, analysert med den utviklede metoden. En kan se i kromatogrammet at kun mannitol og xylose detekteres, og at lactulosekonsentrasjonen er under med målbare området. Toppene til sukkerartene er tydelig adskilt fra de øvrige komponentene i urinen, som tyder på god separasjon.

Ved sammenligning av masse av mannitol og xylose i intervensjonsgruppen og kontrollgruppen, ble det ikke funnet en signifikant forskjell verken ved baseline eller FU ($p > 0,05$). Innad i gruppene var det heller ingen signifikant forskjell på masse av sukkerartene ved baseline og FU ($p > 0,05$). På bakgrunn av dette kan en tenke seg at glutenfritt kosthold ikke har betydning for absorpsjon av mannitol og xylose i tarmen. Det ble imidlertid ikke analysert et stort nok antall urinprøver til å kunne si at dette resultatet gjelder for resten av pasientene i forskningsprosjektet. Dersom en videre konkluderer med at glutenfri diett ikke har effekt på tarmpermeabilitet basert på disse resultatene, gjøres en type 2 feil. Dette vil si at en konkluderer med et falsk negativt resultat, altså at man forkaster en hypotese på feil grunnlag (S. R. Jones et al., 2003)(Aarø, 2007). For å kunne si at glutenfri diett har påvirkning på tarmpermeabilitet, er det nødvendig å beregne L/M-ratio for et stort nok antall pasienter. Videre i forskningsprosjektet vil L/M-ratio for alle pasientene i intervensjonsgruppen og kontrollgruppen beregnes og sammenlignes. I tillegg vil deres verdier sammenlignes med friske kontrollpersoner for å vurdere hva som er normal og unormal L/M-ratio. Resultatene fra analyse av de 56 urinprøvene fra 14 pasienter er hovedsakelig ment som en demonstrasjon på hvordan resultater fra analyse med HPAE-PAD kan beregnes og fremstilles.

4.2.1 Vurdering av glutenscore

Som vist i figur 36 og beregnet i tabell 19, var inntaket av gluten blant deltakerne i intervensjonsgruppen og i kontrollgruppen relativt like ved baseline. Intervensjonsgruppen hadde et noe høyere inntak av gluten enn det kontrollgruppen hadde baseline. Etter en måned inn i prosjektet ble intervensjonsgruppens glutenscore kraftig redusert, med en lav IQR, som forble lav gjennom prosjektperioden. Kontrollgruppen hadde en noe lavere IQR ved start av perioden, men holdt den på samme jevne nivå gjennom prosjektperioden.

Siden glutenscoren var noe høyere for intervensjonsgruppen før prosjektstart enn for kontrollgruppen, kunne en forvente at det ville være vanskeligere for den førstnevnte gruppen

å holde seg til en glutenfri diett resten av prosjektperioden. Resultatene viste imidlertid at deltakere i intervensjonsgruppen hadde en lav glutenscore, og kontrollgruppen en høyere glutenscore, i månedene etter baseline. Glutenscoren viser høy grad av komplians hos intervensjonsgruppen, som vil si at de stort sett har holdt seg til et glutenfritt kosthold.

Medianen, visualisert med en horisontal strek i boksen, deler datasettet i to, der halvparten av datasettet ligger over, og den andre halvparten ligger under denne verdien. Gjennomsnittet av datasettet er markert med et kryss. Dersom fordelingen er symmetrisk, vil medianen og gjennomsnittet være det samme. Ut ifra figuren kan en se at ingen av månedene for kontrollgruppen har et normalfordelt gluteninntak. En kan se at spredningen er stor, da det er punkter høyt oppe og langt nede i diagrammet. For kontrollgruppen ved baseline ligger den høyeste glutenscore-verdien rundt 600 og den laveste verdien rundt 80. Spredningen i kontrollgruppen er også høy for de andre månedene.

For intervensjonsgruppen er det vanskelig å se om datasettet er normalfordelt eller ikke, da verdiene er såpass lave. Ved baseline kan en imidlertid se at spredningen er lavere enn hos kontrollgruppen, da den høyeste glutenscore-verdien ligger rundt 540 og den laveste verdien ligger rundt 120. For de resterende månedene har flertallet av deltakerne i intervensjonsgruppen glutenscore under 20, men i noen av månedene har én til to pasienter høyere glutenscore. For disse pasientene kan det være hensiktsmessig å undersøke spørreskjemaene nærmere, da det kan ha oppstått misforståelser rundt besvarelsene. Det kan være nyttig å sammenligne hvor ofte deltakerne har konsumert gluten i løpet av en måned med hvor lett de syntes det har vært å følge en glutenfri diett. På denne måten kan en vurdere om disse svarene korrelerer.

Det er knyttet usikkerhet til hvor godt egnet en beregnet glutenscore er til å bestemme gluteninntaket til pasientene. Gluteninnhold i matvaregruppene, som er presentert i tabell 18, er estimert på bakgrunn av varedeklarasjoner på representative produkter. Det er ikke tatt hensyn til at gluteninnholdet varierer i produkter fra ulike produsenter, og forskjeller mellom kjøpte og hjemmelagde matvarer. Glutenscoren til pasientene er i tillegg basert på standardiserte porsjonsstørrelser, og det er antatt at alle forsøkspersonene har spist samme porsjonsstørrelser, selv om dette ikke er realistisk. Denne metoden er semikvantitativ og viser kun en tendens til hvordan gluteninntaket til pasientene har vært i løpet av prosjektperioden. Glutenscoren er egnet til å sammenligne det generelle gluteninntaket på gruppenivå, men er trolig lite egnet til å kvantifisere gluteninntaket til hver enkelt pasient. Under avsnitt 4.7

vrderes spørreskjemaene ytterligere, og usikkerheten knyttet til dette som også påvirker glutenscoren.

4.3 Validering av metoden

4.3.1 Kalibrering av metode for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonne

Ved etablering av en prosedyre hvor kalibreringskurve benyttes, skal det bestemmes hva som definerer forholdet mellom konsentrasjonen av analytten i en prøve og det detekterte signal. I en kromatografisk metode benyttes vanligvis topphøyde eller arealet av toppen til å beregne konsentrasjonen. R^2 ble funnet til å være marginalt høyest for areal som funksjon av konsentrasjon for mannitol ($R^2=0,999$), sammenlignet med topphøyde ($R^2=0,998$). For xylose viste det seg å være identisk R^2 for begge signalene, nemlig 0,9986. I applikasjonen fra Thermo Fisher (Hurum & Rohrer, 2016) ble det benyttet areal til bestemmelse av konsentrasjon, og R^2 ble beregnet til 0,999. Ettersom vi fikk tilsvarende resultater, besluttet vi også å benytte areal. Det ble bestemt å benytte 10 standarder med konsentrasjon av mannitol og xylose fra 0,001 mM til 0,2 mM. Dette ble gjort for å skape et tilstrekkelig stort måleområde med direkte korrelasjon mellom toppens areal og konsentrasjon av det aktuelle sukkeret. Ettersom pasientenes diurese i løpet av fem timer varierte i stor grad, varierte følgelig konsentrasjonen av mannitol og xylose også i stor grad mellom pasientene. En slik biologisk variasjon er vanskelig å standardisere. I tillegg er det stor forskjell i konsentrasjon av mannitol i forhold til xylose i én pasients urin, da de konsumerte større mengde xylose enn mannitol. Xylosekonsentrasjonen vil da befinne seg i det øvre sjiktet av måleområdet, mens mannitol befinner seg i det nedre sjiktet.

I tillegg ble det besluttet at 10 konsentrasjonsnivåer i kalibreringskurven var nødvendig for å få en nøyaktig kvantifisering av sukkerartene i hele måleområdet. Den første kalibreringskurven, med 5 nivåer, hadde kun én standardløsning i et høyt konsentrasjonsnivå (0,1 mM), noe som gir større usikkerhet i kvantifisering av sukkerarter med høy konsentrasjon. Til tross for at kurven har en R^2 på 1, noe som tilsier en god korrelasjon mellom areal og konsentrasjon, er avstanden mellom konsentrasjonsnivåene for stor til å kunne være sikker på at dette er riktig. Dersom kurven imidlertid baserer seg på flere punkter

jevnt fordelt i måleområdet, vil funksjonen til kurven defineres ut ifra et større datasett. Dette vil resultere i en mer presis estimering av sukkerartenes konsentrasjon i urinen.

4.3.2 Kontroll av metode for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonne

For å sikre kvaliteten av metoden ble det vurdert om en intern standard (IS) kan benyttes som et hjelpemiddel i vurderingen av presisjonen. Dersom konsentrasjonen av IS er konstant i hver pasientprøve, vil dette indikere at forarbeidet og selve analyseringen er korrekt utført. For at en IS skal være hensiktsmessig å bruke, må den ha lignende egenskaper som analyttene som skal detekteres. Samtidig må den ha retensjonstid ulik analyttene, slik at toppene ikke sammenfaller. Toppen skal i tillegg være høy og smal. Det er viktig at pasientprøvene ikke inneholder andre komponenter som koeluerer med IS, da dette vil gi varierende konsentrasjoner av IS, uten at det nødvendigvis skyldes en analytisk feil (J. Dolan, 2012).

Cellobiose, som figur 31 viser, har “fronting” selv ved lave konsentrasjoner. Det er uklart hvorfor dette oppstår, men asymmetri fører med seg større usikkerhet knyttet til deteksjon. En mulig årsak til asymmetrien er at prøvematerialet er utgått på dato, som kan påvirke dets struktur og reaksjon med kolonnematerialet. Cellobiose har i tillegg lang retensjonstid, som gjør at analysetiden blir lenger. Dette er ugunstig ved analyse av mange pasientprøver. Videre ble det undersøkt om sukkeret melibiose kunne fungere som IS. Melibiose har kort retensjonstid som er fordelaktig, da tilsats av den ikke vil øke den totale analysetiden. Som det imidlertid kommer fram av figur 32 ligger toppen for melibiose tett mellom mannitol og xylose, og det er fare for at toppene vil overlappes dersom konsentrasjonen av analyttene øker. Det ble ikke funnet komponenter i pasienturinen som koeluerer med cellobiose, men det ble funnet komponenter med samme retensjonstid som melibiose. På bakgrunn av disse resultatene, ble det bestemt at verken cellobiose eller melibiose var egnet som IS for denne metoden. Fucose og sorbitol ble også vurdert som mulige IS, men disse karbohydratene ble utelukket da de finnes i en rekke matvarer, og kan være til stede i urinen fra før hos deltakerne (Mack et al., 2018). Ettersom metoden med HPAE-PAD krever lite forarbeid, ble det vurdert at daglig kontroll er tilstrekkelig.

Når det etableres en ny metode, er det nødvendig å vurdere hva slags materiale som skal benyttes for å kontrollere metodens riktighet og presisjon over tid. Det ble testet ut et

syntetisk kontrollmateriale, som besto av xylose- og mannitolørstoff oppløst i vann. På grunn av mangel på tid ble den kun analysert over tre dager. Likevel ble det laget kontrollkort for både mannitol og xylose som er presentert i vedlegg 8. Ut ifra kontrollkortene ser en at det er lite spredning i analyseresultatene fra dag til dag for begge analyttene. Dette er noe SD og CV i tabell 11 også antyder. Dette indikerer at det er lite tilfeldige variasjoner mellom serier, og tyder på god presisjon for metoden (Hovind, 1986). Siden samtlige verdier for mannitol ligger under sann verdi, kan det være en tendens til underestimering. Kontrollen må imidlertid analyseres over flere dager, for å kunne vurdere om det er en systematisk feil (Westgard et al., 1981).

Til tross for tilsynelatende god presisjon, er det flere årsaker til at resultatene fra det syntetiske kontrollmaterialet ikke er tilstrekkelig for å kunne vurdere metodens presisjon og riktighet. Optimalt skal daglig kontroll analyseres i to nivå over en periode på minst 20 dager for mest korrekt vurdering av presisjon (Chesher, 2008). Tillagingen av kontrollmaterialet ble heller ikke utført på korrekt måte, da samme stamløsning av mannitol og xylose også ble brukt ved tillaging av standardløsninger for kalibrering. Det er dermed ingen måte å oppdage feil ved tillaging av stamløsningen eller undersøke tørrstoffets renhet (Magnusson et al., 2018). I tillegg ble kontrollene laget enkeltvis og ikke i et samlet parti, noe som gjorde at materialet ikke var ensartet. For å vurdere metodens presisjon og riktighet på en mer korrekt måte, hadde det vært fordelaktig å analysere kontrollmateriale med kjent fasitverdi i to nivåer fra en ekstern leverandør, og analysert de daglig over en lenger periode.

Det ble også analysert en reell pasientprøve som kontroll, over en periode på seks dager. Gjennomsnittlig masse for mannitol og xylose ble målt til henholdsvis 0,0030 g og 0,0709 g. Etersom kontrollen er en pasienturin, er det ikke mulig å vite sann verdi av analyttene i prøven, slik som er tilfelle for syntetisk kontrollmateriale. Derfor kan ikke denne kontrollen benyttes til å vurdere riktigheten til metoden, kun presisjonen. Det ble beregnet et lavt SD mellom prøvene, på $2,722 \cdot 10^{-4}$ mM for mannitol og $4,778 \cdot 10^{-4}$ mM for xylose. Dette tyder på at betingelser som blant annet tidspunktet analysen utføres på, ulike bufferløsninger eller at analysen gjennomføres av ulike operatører, har liten betydning for prøveresultatene. Det ble beregnet en CV for de 6 dagene på like over presisjonskravet (5,0%). Ved analyse av prøver med lave konsentrasjoner av analytter, kan CV ofte komme over presisjonskravet, da små forskjeller vil gi stort utslag på CV. Siden det kun har blitt analysert seks kontroller, ble det besluttet å gå videre med den reelle pasientprøven som daglig kontroll for å kunne vurdere presisjonen av metoden over en lenger periode.

4.3.3 Recovery og matrikseffekt

Som et trinn i valideringen av metoden ble det beregnet grad av gjenfinning av analytt i prøven, kalt recovery. 100% recovery indikerer at ingenting av analytten har gått tapt i prøveoppbeidelsen. Det er ikke fastsatt en universell nedre grense for akseptabel recovery. Dette fordi en lavere recovery kan godtas for enkelte analytter, dersom deteksjonsmetoden har god sensitivitet for den aktuelle analytten. Resultater fra recovery-undersøkelse skal imidlertid ha god presisjon, være reproduserbart og recovery skal være lik over hele måleområdet (González et al., 2014). Gjennomsnittlig recovery av mannitol og xylose viste seg å være høy ved tilsetning av kjent mengde sukkerarter i pasientprøver både ved fortynning 1:100 og 1:1000. Dette tyder på at lite av sukkerartene går tapt under analyseringen, og en med høy sikkerhet kan stole på kvantifiseringen av sukkerartene. Det var beregnet liten variasjon (CV) i resultatene fra analyseringen av tre replikater, slik vedlegg 2 viser. Dette tyder på god presisjon for resultatene i recovery-undersøkelsen. Det har imidlertid ikke blitt analysert recovery i de samme prøvene over flere dager, og reproduserbarheten kan derfor ikke vurderes. Det ble heller ikke analysert recovery i prøver med ulik konsentrasjon av mannitol og xylose, kun ved én konsentrasjon i det nedre måleområde på 0,05 mM. Derfor er det heller ikke sikkert om grad av recovery er den samme ved høyere konsentrasjonsnivåer.

Gjennomsnittlig recovery viste seg å være marginalt bedre i fortynningsgrad 1:100, enn 1:1000. Dette kan tyde på at noe analytt går tapt ved fortynning 1:1000. Dette kan skyldes at det er større usikkerhet knyttet til nøyaktigheten ved høyere fortynning. Recovery er ikke beregnet for prøver fortynnet 1:2000, og en kan derfor ikke med sikkerhet si om noe av analytten går tapt i pasientprøver ved denne fortynningsgraden.

Matrikseffekt er ikke beregnet i denne oppgaven, men det er anbefalt for å kontrollere at det ikke er interfererende komponenter i urinen, da dette kan ha mye å si for resultatet av recovery. Matrikseffekt har også betydning for valg av kontrollmateriale. Ved lav matrikseffekt vil syntetisk kontrollmateriale være representativt, men dersom det er høy matrikseffekt er det nødvendig å benytte kontrollmateriale av samme matriks som pasientprøvene (Hovind, 1986).

4.3.4 Vurdering av pasientprøvenes presisjon

Pasientprøvene ble analysert i to paralleller, og det ble beregnet CV for å vurdere presisjonen mellom dem. Variasjonen mellom parallellene er størst for den første pasientprøven som ble analysert, der CV er 7,0% for mannitol og 19,6% for xylose. Årsaken til det høye avviket kan komme av pipetteringsfeil, men også feil i beregning av konsentrasjon av dataprogrammet. For den første pasientprøven som ble analysert, var det en betydelig forskjell i hvor programmet valgte å avgrense toppen for de to parallellene. Ved stor bredde er det vanskelig for dataprogrammet å definere hvor toppen starter. Som regel vil endene av toppene være lange og slake når båndspredningen er stor. Da vil det være vanskelig for dataprogrammet å skille enden av toppen i fra grunnlinjen i kromatogrammet, og dermed avgrense toppen korrekt. Det er derfor nødvendig å vurdere kromatogrammene manuelt og forsikre seg om at programmet har avgrenset toppene på samme måte for begge parallellene. Dersom problemet ikke ligger i hvordan programmet har avgrenset toppene, og CV likevel er høy, er det nødvendig å utføre analysen på nytt for å oppdage eventuelle pipetteringsfeil.

CV for de øvrige pasientprøvene viser at det ikke er behov for å analysere to paralleller. Dette fordi at CV mellom parallellene for prøvene, sett bort i fra den første, ligger under grensen for god presisjon på 5,0%. Ved videre arbeid er det derfor kun nødvendig å analysere én parallell slik at en sparer både tid og bufferløsning. Alternativt kan først to paralleller av daglig kontroll analyseres. Dersom CV mellom parallellene er innenfor presisjonskravet, kan de andre pasientprøvene analyseres med kun én parallell.

4.4 Metodologiske betraktninger knyttet til undersøkelse av tarmpermeabilitet med HPAE-PAD

Det er flere ulike metoder som kan benyttes for å detektere karbohydrater i urin. Karbohydrater kan for eksempel bli merket med fluorescerende stoffer og deretter detektert med High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), eller bli derivatisert og detektert med Gas Chromatography-Flame Ionization Detection (GC-FID) (Rohrer, 2021). Et tredje alternativ er direkte deteksjon av karbohydratene i urinprøvene med HPAE-PAD, som er valgt å gjøre i dette prosjektet. HPAE-PAD er en veletablert metode for deteksjon av karbohydrater, men metoden har både fordeler og ulemper. Ved bruk av denne metoden er det

ikke behov for derivatisering før analyse, som ofte er nødvendig ved deteksjon av karbohydrater i urin. Dette er en fordel som gjør at man sparer analysetid, samtidig som man sparer reagensutgifter (Hurum & Rohrer, 2016). I tillegg er HPAE-PAD en metode som kan detektere svært lave konsentrasjoner av karbohydrater i prøvematerialet. Dette er svært gunstig i dette prosjektet, da utskillelsen av lactulose i urin normalt er svært lav. En ulempe med HPAE-PAD er utfordringen med å separere to karbohydrater med tilnærmet lik retensjonstid, som i dette prosjektet er erfart ved separasjon av xylose og lactulose.

4.4.1 Optimalisering av metode for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonne

I denne oppgaven er det blitt gjort ulike utprøvnings for å optimalisere metoden for deteksjon av mannitol og xylose i urin med HPAE-PAD og MA1-kolonne. Det ble først utført utprøvnings med flow-hastighet. Flow-hastigheten vil si hastigheten som den mobile fasen pumpes gjennom kolonnen med. Den defineres som det volumet (mL) av den mobile fasen som passerer gjennom kolonnen per tidsenhet (min) (McNaught & Wilkinson, 1997). Slik det kommer fram i figur 10 til 13, gir en flow-hastighet på 0,4 mL/min høyeste mannitol- og xylosetopper, med smalest bredde og kortest retensjonstid. Dette stemmer godt overens med teorien om at høyere flow-hastighet fører til at komponentene i prøven får mindre tid til å binde seg til kolonnen, og elueres derfor ut raskere. I tillegg vil toppene i kromatogrammet bli høyere og bredden blir smalere, ved høyere flow-hastighet (McNaught & Wilkinson, 1997). Det ble bestemt at det skulle benyttes en flow-hastighet på 0,4 mL/min ved analysing av pasientprøver på MA1-kolonnen, da det også er denne flow-hastigheten som er anbefalt i applikasjonen fra Thermo Fisher (Hurum & Rohrer, 2016). Ved den laveste flow-hastigheten som ble utprøvd, 0,25 mL/min, ble resolusjonen mellom xylose og lactulose høyere enn ved økt flow-hastighet. Det ble imidlertid ikke valgt denne flow-hastigheten da lavere flow-hastighet vil gi lenger analysetid, og det ble vurdert at separasjonen ved høyere flow-hastighet var tilstrekkelig.

Det ble videre undersøkt om en konsentrasjonsgradient ville gi bedre separasjon av xylose og lactulose, enn isokratisk NaOH-konsentrasjon. Formel 5 viser at resolusjonen mellom xylose og lactulose ved isokratisk NaOH-konsentrasjon på 480 mM er 2,22, noe som er akseptabelt da den ifølge teorien bør være større enn 1,2 (Burtis et al., 2008b). Likevel viser figur 14 at det ikke er et tydelig skille mellom toppen for xylose og toppen for lactulose, det er derfor

knyttet usikkerhet til dataprogrammets avgrensning mellom analyttene. Ved å benytte en gradient kan toppenes retensjonstid endres slik at resolusjonen mellom toppene blir bedre. Slik det kommer fram i figur 15 ble ikke resultatet av den utprøvde gradienten som ønsket, da xylose og lactulose koeluerte og dannet én stor topp. Resolusjonen mellom xylose og lactulose ved analyse med konsentrasjonsgradient var ikke mulig å beregne, ettersom toppene eluerte ved samme tid. Andre konsentrasjonsgradienter fungerer muligens bedre enn den som ble utprøvd i dette prosjektet. Det ble imidlertid besluttet å gå bort ifra videre utprøvinger med gradient, da det ble anbefalt fra leverandøren å benytte isokratisk metode. Dette fordi at kolonnen må re-ekvilibreres etter hver gang det analyseres med gradient, og ettersom MA1-kolonnen har stor bindingskapasitet, altså mange bindingssteder, vil dette ta lang tid. Derfor ble det bestemt å benytte en NaOH-konsentrasjon på 480 mM, ettersom dette benyttes i applikasjonen fra Thermo Fisher (Hurum & Rohrer, 2016).

4.4.2 Optimalisering av metode for deteksjon av lactulose med HPAE-PAD og PA20-kolonnen

I denne oppgaven ble det gjort utprøvinger for å optimalisere deteksjon av lactulose i urin med HPAE-PAD og PA20-kolonne. Resultatene fra utprøvingene av flow-hastighet i figur 16 til 19 viser at høyere flow-hastighet fører til kortere retensjonstid, høyere topphøyde, smalere bredde og lavere areal. Dette stemmer overens med teorien om flow-hastighet beskrevet i avsnitt 4.4.1 På PA20-kolonnen anbefaler Thermo Fisher en maksimal flow-hastighet på 0,5 mL/min og minimum flow-hastighet på 0,01 mL/min (Hurum & Rohrer, 2016). For å unngå å overbelaste PA20-kolonnen med for høyt trykk, er det ikke blitt gjennomført utprøvinger med høyere flow-hastighet enn 0,3 mL/min.

Karbohydrater er svake syrer med pKa-verdi mellom 12 og 14, og avhengig av pH i løsningen vil karbohydratene dissosiere i varierende grad (Weiss, 2020). NaOH-konsentrasjonen i den mobile fasen er en viktig betingelse for analysen, ettersom dette bestemmer pH-verdien i løsningen. Konsentrasjonen av NaOH har motstridene effekt på elueringen ettersom den kan gjøre retensjonstiden både lenger og kortere. På den ene siden vil høyere NaOH-konsentrasjon føre til at karbohydratene dissosiere i større grad og får høyere ladning. Da vil karbohydratene binde seg sterkere til kolonnen, slik at det tar lenger tid før de elueres. Høyere NaOH-konsentrasjon vil derfor gi lenger retensjonstid. I tillegg fungerer hydroksidionene som ionebyttere i den mobile fasen, og “dytter” karbohydratene ut av kolonnen. Ved økt NaOH-

konsentrasjon vil det være en større mengde ionebyttere i kolonnen, noe som fører til kortere retensjonstid. I tilfeller der karbohydratene ikke er fullstendig dissosiert, vil disse to effektene utligne hverandre. I tilfeller der karbohydratene er fullstendig dissosiert, er det kun hydroksidionenes funksjon som ionebyttere som vil påvirke retensjonstiden. Sistnevnte tilfelle observeres i figur 20 til 23, der toppen for lactulose får kortere retensjonstid, økt høyde, smalere bredde og større areal ved økt NaOH-konsentrasjon.

Slik figur 24 til 27 viser, resulterer en økning i temperatur til kortere retensjonstid, samt høyere toppler, smalere bredde og større areal. Dette stemmer med teorien om hvordan temperatur påvirker eluering av ulike stoffer. Dolan forklarer i artikkelen «the Importance of Temperature» (J. W. Dolan, 2022) at ulike stoffer påvirkes ulikt av endring i temperatur, og at to toppler kan komme nærmere hverandre dersom den ene påvirkes mer enn den andre. Det bør undersøkes hvordan xylose-toppene påvirkes av temperatur, og vurdere om temperatur er en faktor som kan optimaliseres for å bedre resolusjonen mellom lactulose- og xylose-toppene. Selv om temperatur er noe som en kan justere for å endre på retensjonstidene, har vi i vår metode valgt å holde temperaturen konstant ved 30° C. Det er viktig at temperaturen holdes konstant slik at reproduserbarheten blir best mulig.

Grunnet mangel på tid er det ikke analysert pasienturin med høy flow-hastighet og høy NaOH-konsentrasjon samtidig, og det er usikkert hvorvidt dette vil være gunstig for resolusjonen. Utprøvingene på PA20-kolonnen har enda ikke ført til et godt nok resultat, da prøvene må analyseres ufortynnet for å kunne detektere lactulose. I ufortynnete prøver er imidlertid konsentrasjonen av xylose så høy at kolonnen overbelastes og toppen for xylose får «fronting». Ved et tidspunkt ble det holdt et rådgivningsmøte med teknikker fra Thermo Fisher. Her ble det foreslått ulike alternativer for veien videre. Tiltakene vil bli vurdert av prosjektansvarlig, og eventuelt prøvd ut videre i forskningsprosjektet. Slik den kromatografiske metoden er nå, er det nødvendig å først detektere mannitol og xylose på MA1-kolonnen og deretter bytte til PA20-kolonnen for å detektere lactulose. Dette er ikke ideelt da det er tidkrevende og kostbart å analysere samtlige prøver to ganger.

4.4.3 Fortynning av pasientprøvene slik at konsentrasjonen av lactulose er under deteksjonsnivå

Som forklart i avsnitt 4.3.1 varierer konsentrasjonen av sukkerartene i stor grad grunnet varierende diurese, og inntak av ulik mengde mannitol, xylose og lactulose ved prosjektstart. Den ideelle fortynningen av pasientprøvene for deteksjon av mannitol og xylose er der lactulose er under deteksjonsnivået, samtidig som mannitol er målbart. Når lactulose er under deteksjonsnivået kan en være sikker på at toppen for xylose kun representerer dette sukkeret. Imidlertid vil økt fortynningsgrad gi lavere topphøyde for mannitol, og det er risiko for at mannitol ikke blir detektert.

Resultatene av utprøvingene (tabell 13) viste at en fortynning på 1:500 er fordelaktig da fortynningen på 1:1000 ga en verdi av mannitol som befant seg nær den nedre grensen av måleområdet (0,001mM), noe som ga økt usikkerhet. Imidlertid viste det seg, etter å ha analysert et større antall pasientprøver, at det var nødvendig å fortynne prøvene ulikt på bakgrunn av diurese. For urinprøver der pasientens diurese var over 500 mL/5t ble det benyttet en fortynningsgrad på 1:500. Ved diurese mellom 200 mL/5t og 500 mL/5t ble det benyttet en fortynningsgrad på 1:1000, og der diuresen var under 200 mL/5t ble fortynningsgraden 1:2000 benyttet. Ved disse fortynningene så det ut til at lactulose ligger under deteksjonsnivået, samtidig som mannitol var målbart.

4.5 Spørreskjema som forskningsmetode

Spørreskjemaer ble brukt som metode for innhenting av resultater i dette forskningsprosjektet. Det er viktig å være klar over begrensningene knyttet til denne metoden, og til hvilken grad resultatene kan gi svar på det en lurte på. Skjemaene ble delt ut til deltakerne, enten på papir eller digitalt, og ble senere samlet inn igjen. Denne formen for spørreundersøkelser er fordelaktige dersom en vil nå ut til mange personer, sammenlignet med telefon-intervju eller fysisk intervju med pasienten. På den andre siden krever det at pasienten selv tar initiativ til å fylle ut spørreskjemaene, noe som gir økt risiko for responsbias (T. L. Jones et al., 2013). Det ble sendt ut 1339 skjemaer ved baseline og FU samt ett FFQ hver måned i 5 måneder, til 103 pasienter. Dette er relativt mange spørreskjemaer, og det ble observert at 207 skjemaer ikke ble fylt ut. Dette tilsvarer en andel på 15%. Av denne grunn kan en diskutere hvorvidt det burde vært færre spørreskjemaer som pasientene skulle fylle ut, som muligens ville økt graden

av respons hos pasientene. Et alternativ kunne vært at de skulle fylle ut FFQ kun hver 3. måned, altså 3 ganger i tillegg til oppstarten og slutten av perioden. På en annen side kunne dette gitt mindre sikre svar, da de er nødt til å huske hva de har spist over en lenger periode, dette kalles hukommelsesbias (Coughlin, 1990). I tillegg skulle deltakerne kun krysse av på ett alternativ for hvor ofte de hadde spist maten i de ulike matvaregruppene. Denne måten å formulere spørsmålet på er lite nyansert da noen av matvaregruppene i FFQ inneholder flere matvarer. Et eksempel på en matvaregruppe er “Pizza, burger og pitabrød”. Gluteninnholdet i disse matvare kan variere og det er vanskelig å beregne hvor mye gluten vedkommende faktisk har inntatt. Slike formuleringer gir imidlertid svar som er enklere å bearbeide, enn ukategorisert loggføring som må tolkes i etterkant.

Et problem som oppsto under bearbeidelsen av spørreskjemaene som var fylt ut på papir, var at enkelte pasienter hadde krysset av for to alternativer på samme spørsmål. I tillegg var det tilfeller der pasienten hadde svart blankt for et eller flere spørsmål. Dette kan være fordi pasienten ikke var sikker på hvor mye vedkommende hadde spist av den aktuelle matvaren, eller at spørsmålet ble oversett. Det ble vurdert som for upresist å anta hva som var det korrekte svaret, både i tilfeller der det var krysset av på to alternativer og i tilfeller der et alternativ var blankt. Svaret på disse spørsmålene ble derfor notert som “not available” (NA) i RedCap.

De nevnte usikkerhetene er også nødvendig å ta med i betraktning når en skal vurdere hvor godt egnet data fra spørreskjemaer er til å måle gluteninntak for pasientene. Bestemmelsen av gluteninntak til pasientene er kun semikvantitativ da de kun svarte på hvor *ofte* de konsumerte de ulike matvarene, og ikke oppga *størrelsen* på porsjonene. I oppstarten av forskningsprosjektet ble det diskutert hvorvidt det hadde vært mer gunstig å be pasienten om å veie eller ta bilde av måltidene sine. De første deltakerne ble bedt om å fotografere sine måltider, men det ble fort tydelig at færre pasienter ønsket å delta i studien dersom de ble bedt om å gjøre dette. Det er derfor viktig å finne en middelvei der det ikke kreves for mye av pasientene, samtidig som informasjonen som samles inn er av god kvalitet.

4.6 Konklusjon og veien videre

I denne oppgaven har det blitt etablert en god metode for deteksjon av mannitol og xylose med HPAE-PAD og MA1-kolonne. Det bør imidlertid analyseres flere kontrollprøver og pasientprøver, for å sikre metodens presisjon og riktighet. Det er i tillegg forsøkt å optimalisere metoden for deteksjon av lactulose med HPAE-PAD og PA20-kolonnen, uten ønskede resultater. Det har blitt etablert en metode for å bestemme gluteninntaket til pasientene basert på deres svar på FFQ, men det er imidlertid knyttet usikkerhet til hvor godt egnet denne metoden kan kvantifisere gluteninntaket til pasientene. Videre er det tenkt at glutenscoren til hver pasient skal sammenlignes opp mot deres L/M-ratio, og undersøke om det er en korrelasjon mellom gluteninntak og tarmpermeabilitet. Det vil også bli vurdert om tarmpermeabiliteten til pasientene i intervensjonsgruppen er signifikant lavere enn hos pasientene i kontrollgruppen, og hos friske kontrollpersoner. På denne måten vil det forhåpentligvis være mulig å si noe om påvirkningen gluten har på pasientenes tarmpermeabilitet. Dette vil gi økt kunnskap om hvorvidt tarmens immunforsvar og permeabilitet kan henge sammen med utviklingen av autoimmune sykdommer, som multippel sklerose.

5.0 Referanser

- Altman, D. G. (1990). *Practical Statistics for Medical Research*. CRC Press.
- Arneth, B. (2020). Multiple Sclerosis and Smoking. *The American Journal of Medicine*, *133*(7), 783–788. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.03.008>
- Bagert, B. A. (2009). Epstein-barr virus in multiple sclerosis. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *9*(5), 405–410. <https://doi.org/10.1007/s11910-009-0059-9>
- Barboza Jr., M. S., Silva, T. M. J., Guerrant, R. L., & Lima, A. A. M. (1999). Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *32*(12), 1499–1504. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1999001200008>
- Berkes, J. (2003). Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: Effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut*, *52*(3), 439–451. <https://doi.org/10.1136/gut.52.3.439>
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Ng, L. G., Kundu, P., Gulyás, B., Halldin, C., Hultenby, K., Nilsson, H., Hebert, H., Volpe, B. T., Diamond, B., & Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science translational medicine*, *6*(263). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759>
- Burtis, C. A., Ashwood, E. R., & Bruns, D. E. (2008a). Chromatography. I *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6. utg., s. 112–127). Saunders Elsevir.
- Burtis, C. A., Ashwood, E. R., & Bruns, D. E. (2008b). Resolution. I *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6. utg., s. 116–117). Saunders Elsevir.
- Buscarinu, M. C., Cerasoli, B., Annibali, V., Policano, C., Lionetto, L., Capi, M., Mechelli, R., Romano, S., Fornasiero, A., Mattei, G., Piras, E., Angelini, D. F., Battistini, L., Simmaco, M., Umeton, R., Salvetti, M., & Ristori, G. (2017). Altered intestinal permeability in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis: A pilot study. *Multiple Sclerosis Journal*, *23*(3), 442–446. <https://doi.org/10.1177/1352458516652498>
- Cade, J., Thompson, R., Burley, V., & Warm, D. (2002). Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires – a review. *Public Health Nutrition*, *5*(4), 567–587. <https://doi.org/10.1079/PHN2001318>
- Chesher, D. (2008). Evaluating Assay Precision. *The Clinical Biochemist Reviews*, *29*(Suppl 1), S23–S26.
- Clemente, M. G., Virgiliis, S. D., Kang, J. S., Macatagney, R., Musu, M. P., Pierro, M. R. D., Drago, S., Congia, M., & Fasano, A. (2003). Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*, *52*(2), 218–223. <https://doi.org/10.1136/gut.52.2.218>
- Corradini, C., Cavazza, A., & Bignardi, C. (2012). High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. <https://doi.org/10.1155/2012/487564>

- Cotton, F., Weiner, H. L., Jolesz, F. A., & Guttmann, C. R. G. (2003). MRI contrast uptake in new lesions in relapsing-remitting MS followed at weekly intervals. *Neurology*, *60*(4), 640–646. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000046587.83503.1e>
- Coughlin, S. S. (1990). Recall bias in epidemiologic studies. *Journal of Clinical Epidemiology*, *43*(1), 87–91. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(90\)90060-3](https://doi.org/10.1016/0895-4356(90)90060-3)
- Cronin, C. C., Feighery, A., Ferriss, J. B., Liddy, C., Shanahan, F., & Feighery, C. (1997). High prevalence of celiac disease among patients with insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. *The American Journal of Gastroenterology*, *92*(12), 2210–2212.
- Dalbro, S. E. J., & Kerty, E. (2019). Atypisk optikusnevritt. *Tidsskrift for Den norske legeforening*. <https://doi.org/10.4045/tidsskr.18.0967>
- Delli, A. J., & Lernmark, Å. (2014). Chapter 41—Autoimmune (Type 1) Diabetes. I N. R. Rose & I. R. Mackay (Red.), *The Autoimmune Diseases (Fifth Edition)* (5. utg., s. 575–586). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384929-8.00041-1>
- DL-Xylose. (2022, 06). PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/644160>
- Dolan, J. (2012). When Should an Internal Standard be Used? *LCGC North America*, *30*(6), 474–480.
- Dolan, J. W. (2022). The Importance of Temperature. *LCGC North America*, *20*(6). <http://www.lcresources.com/tsbible/20062002.pdf>
- Dominguez-Villar, M., Baecher-Allan, C. M., & Hafler, D. (2011). Identification of T helper type 1–like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nature medicine*, *17*(6), 673–675. <https://doi.org/10.1038/nm.2389>
- Dyment, D. A., Ebers, G. C., & Dessa Sadovnick, A. (2004). Genetics of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, *3*(2), 104–110. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00663-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00663-X)
- Ebers, G. C. (2008). Environmental factors and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, *7*(3), 268–277. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70042-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70042-5)
- Edogawa, S., Peters, S. A., Jenkins, G. D., Gurunathan, S. V., Sundt, W. J., Johnson, S., Lennon, R. J., Dyer, R. B., Camilleri, M., Kashyap, P. C., Farrugia, G., Chen, J., Singh, R. J., & Grover, M. (2018). Sex differences in NSAID-induced perturbation of human intestinal barrier function and microbiota. *The FASEB Journal*, *32*(12), 6615–6625. <https://doi.org/10.1096/fj.201800560R>
- Edwards, S. M., Cunningham, S. A., Dunlop, A. L., & Corwin, E. J. (2017). The Maternal Gut Microbiome during Pregnancy. *MCN. The American journal of maternal child nursing*, *42*(6), 310–317. <https://doi.org/10.1097/NMC.0000000000000372>
- Fagudvalget for multipel sklerose. (2016). *Behandlingsvejledning inklusiv lægemiddelrekommandation for sygdomsmodificerende behandling af multipel sklerose* (Nr. 226736). Rådet for Anvendelse af Dyr Sygehusmedicin. <https://www.regioner.dk/media/1900/beh-inklusive-lmr-ms-jan-2016.pdf>
- Faiz, K. W., & Gjerstad, L. (18/01-22). MS – multipel sklerose. I *Store medisinske leksikon*. http://sml.snl.no/MS_-_multipel_sklerose
- Fasano, A. (2001). Intestinal zonulin: Open sesame! *Gut*, *49*(2), 159–162. <https://doi.org/10.1136/gut.49.2.159>
- Frida—Database med fødevarerdata udgivet DTU Fødevareinstituttet. (2022). <https://frida.fooddata.dk/>
- Funda, D. P., Kaas, A., Bock, T., Tlaskalová-Hogenová, H., & Buschard, K. (1999). Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*,

- 15(5), 323–327. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-7560\(199909/10\)15:5<323::AID-DMRR53>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-7560(199909/10)15:5<323::AID-DMRR53>3.0.CO;2-P)
- González, O., Blanco, M. E., Iriarte, G., Bartolomé, L., Maguregui, M. I., & Alonso, R. M. (2014). Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *Journal of Chromatography A*, 1353, 10–27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.077>
- Grootjans, J., Thuijls, G., Verdam, F., Derikx, J. P., Lenaerts, K., & Buurman, W. A. (2010). Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2(3), 61–69. <https://doi.org/10.4240/wjgs.v2.i3.61>
- Hansen, N. E., Haunsø, S., & Chaffalitzky, O. B. (2004). Medisinsk Kompendium Bind 2. I *Medicinsk kompendium Bind 2* (16. utg., s. 1531, 2640–2645). Nyt Nordisk Forlag Arnold Busk.
- Harvey, D. (2000). Chromatographic Resolution. I *Modern Analytical Chemistry*. McGraw-Hill. http://dpwadweb.depauw.edu/harvey_web/eTextProject/AC2.1Files/AnalChem2.1.pdf
- Harvey, D. (2016). I *Modern analytical chemistry* (2.1, s. 297–300). McGraw-Hill Companies.
- Hauser, S. L., & Cree, B. A. C. (2020). Treatment of Multiple Sclerosis. *The American journal of medicine*, 133(12), 1380-1390.e2. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.049>
- Hedström, A. K., Bäärnhielm, M., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2009). Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology*, 73(9), 696–701. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181b59c40>
- Heidari, S., Babor, T. F., De Castro, P., Tort, S., & Curno, M. (2016). Sex and Gender Equity in Research: Rationale for the SAGER guidelines and recommended use. *Research Integrity and Peer Review*, 1(2). <https://doi.org/10.1186/s41073-016-0007-6>
- Helmer, O. M., & Fouts, P. J. (1930). *GASTRO-INTESTINAL STUDIES. VII. THE EXCRETION OF XYLOSE IN PERNICIOUS ANEMIA*. menzi
- Hernandez, A. L., O'Connor, K. C., & Hafler, D. A. (2014). Chapter 52—Multiple Sclerosis. I N. R. Rose & I. R. Mackay (Red.), *The Autoimmune Diseases (Fifth Edition)* (5. utg., s. 735–756). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384929-8.00052-6>
- Hollon, J., Puppa, E. L., Greenwald, B., Goldberg, E., Guerrerio, A., & Fasano, A. (2015). Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with non-celiac gluten sensitivity. *Nutrients*, 7(3), 1565–1576. <https://doi.org/10.3390/nu7031565>
- Hoppe, C., Trolle, E., Gondolf, U. H., & Husby, S. (2013). Gluten intake in 6-36-month-old Danish infants and children based on a national survey. *Journal of Nutritional Science*, 2, 1–7. <https://doi.org/10.1017/jns.2013.1>
- Horai, R., Zárate-Bladés, C. R., Dillenburg-Pilla, P., Chen, J., Kielczewski, J. L., Silver, P. B., Jittayasothorn, Y., Chan, C.-C., Yamane, H., Honda, K., & Caspi, R. R. (2015). Microbiota-dependent activation of an autoreactive T cell receptor provokes autoimmunity in an immunologically privileged site. *Immunity*, 43(2), 343–353. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.014>

- Hovind, H. (1986). *Intern kvalitetskontroll; Håndbok for vannanalyselaboratorier*. Norsk institutt for vannforskning. https://niva.brage.unit.no/niva-xmlui/bitstream/handle/11250/204568/1897_72dpi.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Hurley, J. C. (1995). Endotoxemia: Methods of detection and clinical correlates. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(2), 268–292.
- Hurum, D., & Rohrer, J. (2016). *Determination of Carbohydrates in Urine by HPAE-PAD*. Thermo Fisher Scientific Inc. https://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/CMD%20Documents/Application%20%26%20Technical%20Notes/Chromatography/Liquid%20Chromatography/Liquid%20Chromatography%20Modules/Detectors/113701-AN1006-IC-Carbo-Urine-HPAE-PAD-09Aug2012-AN70088_E.pdf
- Ion Exchange Chromatography*. (u.å.). Hamilton Company. <https://www.hamiltoncompany.com/laboratory-products/hplc-columns/ion-exchange-chromatography>
- Jones, S. R., Carley, S., & M. Harrison. (2003). An introduction to power and sample size estimation. *Emergency Medicine Journal*, 20(5), 453–458. <https://doi.org/10.1136/emj.20.5.453>
- Jones, T. L., Baxter, M. a. J., & Khanduja, V. (2013). A quick guide to survey research. *Annals of The Royal College of Surgeons of England*, 95(1), 5. <https://doi.org/10.1308/003588413X13511609956372>
- Kiesslich, R., Goetz, M., Angus, E. M., Hu, Q., Guan, Y., Potten, C., Allen, T., Neurath, M. F., Shroyer, N. F., Montrose, M. H., & Watson, A. J. M. (2007). Identification of Epithelial Gaps in Human Small and Large Intestine by Confocal Endomicroscopy. *Gastroenterology*, 133(6), 1769–1778. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.09.011>
- King, R. (2020). *Atlas of MS, 3rd Edition*. Multiple Sclerosis International Federation. <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2020/10/Atlas-3rd-Edition-Epidemiology-report-EN-updated-30-9-20.pdf>
- Kõiv, V., & Tenson, T. (2021). Gluten-degrading bacteria: Availability and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(8), 3045–3059. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11263-5>
- Kroppsmasseindeks (KMI / BMI) og helse. (2015). I *Folkehelseinstituttet*. <https://www.fhi.no/fp/overvekt/kroppsmasseindeks-kmi-og-helse/>
- Kurtzke, J. (2014). EDSS Definitioner. I *Glostrup Hospital Neurologisk Afdeling*. *Lactulose*. (u.å.). Chemical Book. Hentet 5. mai 2022, fra https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2779607.htm
- Lebwohl, B., Sanders, D. S., & Green, P. H. R. (2018). Coeliac disease. *The Lancet*, 391(10115), 70–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31796-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31796-8)
- Lerner, A., & Matthias, T. (2015). Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease | Elsevier Enhanced Reader. *Autoimmunity Reviews*, 14, 479–489. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.01.009>
- Mack, C. I., Weinert, C. H., Egert, B., Ferrario, P. G., Bub, A., Hoffmann, I., Watzl, B., Daniel, H., & Kulling, S. E. (2018). The complex human urinary sugar profile: Determinants revealed in the cross-sectional KarMeN study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 108(3), 502–516. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy131>

- Mackenbach, J. P., Stirbu, I., Roskam, A.-J. R., Schaap, M. M., Menvielle, G., Leinsalu, M., Kunst, A. E., & European Union Working Group on Socioeconomic Inequalities in Health. (2008). Socioeconomic inequalities in health in 22 European countries. *The New England Journal of Medicine*, *358*(23), 2468–2481.
<https://doi.org/10.1056/NEJMsa0707519>
- Magnusson, B., Hovind, H., Krysell, M., Lund, U., & Mäkinen, I. (2018). *Inter Quality control, Nordtest Report TR 569* (5. utg.). http://www.nordtest.info/wp/wp-content/uploads/2018/04/NT_TR_569_ed5_1_Internal_Quality_Control_English.pdf
- Mannitol. (2022, 06). PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6251>
- McNaught, A. D., & Wilkinson, A. (1997). *Flow rate (in chromatography)*. 1.
- Menzies, Ian S., Pounder, R., Heyer, S., Laker, Michael F., Bull, J., Wheeler, Patrick G., & Creamer, B. (1979). ABNORMAL INTESTINAL PERMEABILITY TO SUGARS IN VILLOUS ATROPHY. *The Lancet*, *314*(8152), 1107–1109.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(79\)92507-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(79)92507-8)
- Miller, D. H., Chard, D. T., & Ciccarelli, O. (2012). Clinically isolated syndromes. *The Lancet Neurology*, *11*(2), 157–169. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70274-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70274-5)
- Misra, A. (2010). *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics* (1. utg.). Elsevier.
- Molberg, Ø., Mcadam, S. N., Körner, R., Quarsten, H., Kristiansen, C., Madsen, L., Fugger, L., Scott, H., Norén, O., Roepstorff, P., Lundin, K. E. A., Sjöström, H., & Sollid, L. M. (1998). Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nature Medicine*, *4*(6), 713–717.
<https://doi.org/10.1038/nm0698-713>
- Mumenthaler, M., Mattle, H., & Mumenthaler, M. (2004). *Neurology: 210 tables* (4., rev.enlarged ed). Thieme.
- Myhr, K.-M. (2008). Diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, *117*(s188), 12–21. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01026.x>
- Obermeier, B., Mentele, R., Malotka, J., Kellermann, J., Kümpfel, T., Wekerle, H., Lottspeich, F., Hohlfeld, R., & Dornmair, K. (2008). Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nature Medicine*, *14*(6), 688–693. <https://doi.org/10.1038/nm1714>
- Petrie, K. (2007). *Nervous System*. Checkerboard Library.
<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=402236&site=ehost-live>
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Río, J., Comabella, M., & Montalban, X. (2011). Multiple sclerosis: Current treatment algorithms. *Current Opinion in Neurology*, *24*(3), 230–237.
<https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e328346bf66>
- Rodrigo, L., Hernández-Lahoz, C., Fuentes, D., Mauri, G., Alvarez, N., Vega, J., & González, S. (2014). Randomised Clinical Trial Comparing the Efficacy of A Gluten-Free Diet Versus A Regular Diet in A Series of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients. *International Journal of Neurology and Neurotherapy*, *1*(1).
<https://doi.org/10.23937/2378-3001/1/1/1012>
- Rohrer, J. (2021). *Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD)*. Thermo Fisher

- Scientific Inc. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Technical-Notes/tn-20-hpac-pad-carbohydrates-tn70671-en.pdf>
- Rose, N. R., & Mackay, I. R. (2014). *The Autoimmune Diseases: Bd. Fifth edition* (5. utg.). Academic Press.
<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=485871&site=ehost-live>
- Rosso, M., & Chitnis, T. (2020). Association Between Cigarette Smoking and Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA Neurology*, *77*(2), 245–253.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.4271>
- Sategna-Guidetti, C., Grosso, S., Pulitanó, R., Benaduce, E., Dani, F., & Carta, Q. (1994). Celiac disease and insulin-dependent diabetes mellitus. Screening in an adult population. *Digestive Diseases and Sciences*, *39*(8), 1633–1637.
<https://doi.org/10.1007/BF02087768>
- Saunders, C. (2011). *What nurses know... Multiple Sclerosis*. DemosHealth.
- Scherf, K. A., Koehler, P., & Wieser, H. (2016). Gluten and wheat sensitivities – An overview. *Journal of Cereal Science*, *67*, 2–11.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.008>
- Şen, S. (2018). Neurostatus and EDSS Calculation with Cases. *Archives of Neuropsychiatry*, *55*(Suppl 1), S80–S83. <https://doi.org/10.29399/npa.23412>
- Stevens, L., & Rashid, M. (2008). Gluten-free and regular foods: A cost comparison. *Canadian Journal of Dietetic Practice and Research*, *69*(3), 147–150.
<https://doi.org/10.3148/69.3.2008.147>
- The Optic Neuritis Study Group. (2008). Multiple Sclerosis Risk After Optic Neuritis: Final Optic Neuritis Treatment Trial Follow-up. *Archives of Neurology*, *65*(6), 727–732.
<https://doi.org/10.1001/archneur.65.6.727>
- Thermo Scientific. (2013). *Dionex CarboPac MA1 Column Product Manual*. Thermo Fisher Scientific. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-065546-CarboPac-MA1-Column-Man065546-EN.pdf>
- Thermo Scientific. (2018). *Dionex CarboPac PA20 Column Product Manual*. Thermo Fisher Scientific. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/man-031884-carbopac-pa20-columns-man031884-en.pdf>
- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M. S., Fujihara, K., Galetta, S. L., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Marrie, R. A., Miller, A. E., Miller, D. H., Montalban, X., ... Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*, *17*(2), 162–173.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
- Thomsen, H. L., Jessen, E. B., Passali, M., & Frederiksen, J. L. (2019). The role of gluten in multiple sclerosis: A systematic review. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, *27*, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.10.019>
- Trapp, B. D., Peterson, J., Ransohoff, R. M., Rudick, R., Mörk, S., & Bö, L. (1998). Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, *338*(5), 278–285. <https://doi.org/10.1056/NEJM199801293380502>
- Visser, J., Rozing, J., Sapone, A., Lammers, K., & Fasano, A. (2009). Tight Junctions, Intestinal Permeability, and Autoimmunity Celiac Disease and Type 1 Diabetes

- Paradigms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165, 195–205.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04037.x>
- Weiss, D. J. (2020). *Basics of Ion Chromatography*. Thermo Fisher Scientific.
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/eb-73440-basics-of-ion-chromatography-eb73440-en.pdf>
- Westgard, J. O., Barry, P. L., Hunt, M. R., & Groth, T. (1981). A Multi- Rule Shewhart Chart for Quality Control in Clinical Chemistry. *Clinical Chemistry*, 27(3).
<https://westgard.org/html/files/8/63901/63989/MultirulePaper.pdf>
- Whitacre, C. C., Reingold, S. C., & O’Looney, P. A. (1999). A gender gap in autoimmunity. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5406), 1277–1278.
<https://doi.org/10.1126/science.283.5406.1277>
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24(2), 115–119.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004>
- Ygil, K. H. (2013). *Mål, vægt og portionsstørrelser på fødevarer*. Fødevarinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet.
<https://www.yumpu.com/da/document/read/44042500/mal-vaegt-og-portionsstrelser-pa-fdevarer-dtu-orbit-danmarks->
- Aarø, L. E. (2007). *En innføring i survey-metoden (2. Utgave)*. Universitetet i Bergen.
<https://core.ac.uk/download/pdf/30896258.pdf>

6.0 Vedlegg

VEDLEGG 1: PROSEDYRE FOR DETEKSJON AV MANNITOL OG XYLOSE PÅ HIGH PERFORMANCE ANION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY MED PULSED AMPEROMETRIC DETECTION (HPAE-PAD)	89
VEDLEGG 2: RESULTATER FRA RECOVERY-FORSØK	91
VEDLEGG 3: BEREGNING AV GLUTENSCORE FOR HVER MATVARE.....	92
VEDLEGG 4: OPTIMALISERING AV ANALYSE PÅ MA1-KOLONNEN FOR DETEKSJON AV MANNITOL OG XYLOSE: RETENSJONSTID, HØYDE OG BREDDE FOR MANNITOL- OG XYLOSETOPP ANALYSERT MED ULIKE FLOW-HASTIGHETER	94
VEDLEGG 5: OPTIMALISERING AV ANALYSE PÅ PA20-KOLONNEN FOR DETEKSJON AV MANNITOL OG XYLOSE.....	95
VEDLEGG 6: KORRELASJON MELLOM KONSENTRASJON OG TOPPHØYDE OG AREAL FOR STANDARDLØSNINGENE.....	97
VEDLEGG 7: KONSENTRASJON DETEKTERT AV DE ULIKE STANDARDENE I KALIBRERINGSKURVEN.....	101
VEDLEGG 8: KONTROLLKORT FOR SYNTETISK KONTROLL	102
VEDLEGG 9: MANNITOL GJENFUNNET I PASIENTPRØVER ANALYSERT MED HPAE-PAD PÅ MA1-KOLONNEN	104
VEDLEGG 10: XYLOSE GJENFUNNET I PASIENTPRØVER ANALYSERT MED HPAE-PAD PÅ MA1-KOLONNEN	105

Vedlegg 1: Prosedyre for deteksjon av mannitol og xylose på High Performance Anion Exchange Chromatography med Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD)

Hensikt

Dette er en prosedyre for deteksjon av mannitol og xylose i urinprøver med HPAE-PAD med Dionex CarboPac MA1-kolonnesett.

Fremgangsmåte

Hent startprøve og FU prøve for én pasient som er lagret ved -80°C.

Tin urinprøvene i ca 15 minutter i romtemperatur. Skriv ID på eppendorf-rør og hetteglass mens prøvene tiner.

Vortex prøvene kort.

Mål eventuelt densitet dersom dette mangler med digitalt refraktometer (ATAGO PAL-10S).

(Følg fremgangsmåten som er vedlagt med instrumentet.)

Still sentrifugen på innstillingene presentert i tabell 1.1 og sentrifuger først en gang uten pasientprøvene for å oppnå korrekt temperatur. Sentrifuger så urinprøvene.

Tabell 1.1: Oversikt over innstillingene for sentrifugering av urinprøvene.

Tid	5 minutter
G	15000 g
Temperatur	4° C
Akselerasjon	Normal

Legg pasientprøvene i en kjøleveske med kjøleelement for å bevare temperaturen på 4°C under transport til analysebenk.

Avpipeter supernatanten i et eppendorfrør som er merket med ID og dato for prøvetaking.

Fortynn to paralleller av både startprøven og FU prøven. Lag først en 1:50 fortynning, og fortynn deretter videre til 1:500. Videre fortynning avhenger av pasientens diurese:

- Dersom diurese er <200mL / 5t: prøve fortynnes 1:2000
- Dersom diurese er 200 – 500mL /5t: prøve fortynnes 1:1000
- Dersom diurese er >500mL /5t: prøve fortynnes 1:500

Tabell 1.2 gir en oversikt over hvordan de videre fortynningene skal utføres.

Tabell 1.2: Oversikt over hvordan videre fortynning skal gjennomføres.

Fortynningsgrad	Pasientprøve, µL	MilliQ-vann, µL	Sluttvolum
1:50	20	980	1000 µL
1:500	100 (fra fortynning 1:50)	900	1000 µL
1:1000	500 (fra fortynning 1:500)	500	1000 µL
1:2000	500 (fra fortynning 1:1000)	500	1000 µL

Obs! Bruk samme pipetter for hver analysering, og bruk hansker.

Overfør fortynningene i eppendorfrørene til de merkede hetteglassene og sett på kork.

Legg inn ny analyse for prøvene på Chromeleon med metoden presentert i tabell 1.3.

Tabell 1.3: Metoden som urinprøvene skal analyseres på, for deteksjon av mannitol og xylose, med HPAE-PAD.

Kolonne	Dionex CarboPac MA1-kolonne og -forkolonne
Bufferløsning	480 mM NaOH
Flow-hastighet	0,4 mL/min
Injeksjonsvolum	25 µL
Temperatur	30 °C
Deteksjonsmetode	PAD
Analysetid	35 minutter

Sett hetteglassene i riktige posisjoner i autosampleren, og trykk på “start”.

Analysér en prøve med rent Milli-Q vann med jevne mellomrom mellom analysering av pasientprøver eller kontroller

Vurdering av kromatogrammer for vannprøvene:

Dykk og topper i starten av kromatogrammet er ok. Dersom det er topper senere i kromatogrammet er det noe i kolonnen som må renses før pasientprøve kan analyseres.

Kromatogrammet skal vurderes med y-akse på +/- 5 nC.

Dersom det er mye støy i kromatogrammet, skal følgende gjennomføres:

- Analysere ny vannprøve med rent Milli-Q vann
- Rense Dionex CarboPac MA1-kolonnen med NaOH-buffer
- Rense Dionex CarboPac MA1 guard med NaOH-buffer

Vedlegg 2: Resultater fra recovery-forsøk i tre replikater av samme pasientprøve

Prøve	Replikat	Retentionstid		Areal	
		Mannitol	Xylose	Mannitol	Xylose
Pasienturin 1:100	1	19,95	24,984	11,5359	172,736
	2	19,959	24,984	11,2472	166,8327
	3	19,959	24,984	11,2868	167,7812
CV (%)		0,026	0,00	1,38	1,87
Pasienturin 1:1000	1	19,942	24,992	0,9298	17,0618
	2	19,942	24,984	0,9351	17,2149
	3	19,942	24,975	0,8918	16,535
CV (%)		0,00	0,03	2,57	2,11
Mix 0.05mM xylose & mannitol	1	19,959	24,992	45,3516	32,2685
	2	19,959	24,984	45,1133	32,0329
	3	19,959	24,984	45,1267	32,5242
CV (%)		0,00	0,02	0,30	0,76
Pasienturin 1:100 tilsatt mix 0.05mM xylose & mannitol	1	19,959	24,984	56,4225	201,4559
	2	19,959	24,984	56,3139	200,4413
	3	19,95	24,975	56,2468	197,4306
CV (%)		0,03	0,02	0,16	1,05
Pasienturin 1:1000 tilsatt mix 0.05mM xylose & mannitol	1	19,959	24,984	45,528	48,7259
	2	19,95	24,984	47,2223	48,2507
	3	19,95	24,975	45,7995	49,0242
CV (%)		0,026	0,021	1,970	0,802

Vedlegg 3: Beregning av gluteninnhold i hver matvare fra spørreskjema

Matvare	Porsjonsstørrelse (g)	Protein i matvare pr 100 g	Estimert protein pr porsjon (g) fra hvetе/rug/byg	Andel av protein fra hvetе/rug/byg (%)	Kornetype	Gluten pr porsjon (g)	Kommentar
Rugbrød	90	5,1	-	100	rug	2,9835	
Franskbrød	80	8,8	-	100	hvetе	5,632	
Bolle	70	8,6	-	100	hvetе	4,816	
Pasta og nudler (ikke risnudler)	150	5	-	100	hvetе	6	
Pizza, burger og pitabrød	80	7,6	-	100	hvetе	4,864	
Havregryn	-	-	-	-	-	-	Inneholder kun spor av gluten
Frokostblanding (Havrefras, Rugfras, Cheerios, Cornflakes)	30	6,7	-	100	hvetе	1,608	
Kake	60	5,3	-	47	hvetе	1,19568	
Kjeks	30	6,5	-	100	hvetе	1,56	
Valfær	100	6,5	-	46	hvetе	2,392	
Panering (rasp)	20	10,7	-	100	hvetе	1,712	

Bulgur, couscous, perlespelt, perlebygg, perlerug	40	10,8	-	100	hvete	3,456	
Grøt (m hvete, bygg eller rug)	150	4,9	-	75	bygg	2,75625	
Leverpostei og paté	20	-	0,6	3	hvete	0,04656	
Wienerpølse	100	-	0,097	1 g / porsjon	hvete	0,0776	
Sjokolade med kjeks (Kit Kat)	25	-	4,25	17	hvete	0,3298	
Øl	330	0,3	-	100	bygg	0,495	
Sprøstekt løk	5	-	1,1	22	hvete	0,08536	1,1 g protein fra hvetemel pr porsjon
Saus jevnet med mel	3	9,7	-	100	hvete	0,2328	en teskje hvetemel (3 g) pr porsjon
Matfløte	50	-	1	2	hvete	0,0776	1 g hvetemel pr porsjon
Ferdige middagsretter	225	-	54	24	hvete	4,1904	
Soyasaus	15	-	0,15	1% hvetemel pr porsjon	hvete	0,01164	1% hvetemel pr porsjon

Vedlegg 4: Resultater fra optimalisering av analyse på MA1-kolonnen for deteksjon av mannitol og xylose: retensjonstid, høyde, bredde og areal for mannitol- og xylosetopp analysert med ulike flow-hastigheter

Flow-hastighet (mL/min)	Høyde (nC)		Areal (nC*min)		Retensjonstid (min)		Bredde (min)	
	Mannitol	Xylose	Mannitol	Xylose	Mannitol	Xylose	Mannitol	Xylose
0,25	69,590	36,340	66,407	42,360	31,667	39,117	0,869	1,051
0,3	75,170	42,360	60,212	40,767	26,200	32,192	0,735	0,879
0,4	79,490	48,740	53,224	38,242	19,417	23,758	0,577	0,713

Vedlegg 5: Resultater fra optimalisering av analyse på PA20-kolonnen for deteksjon av mannitol og xylose; retensjonstid, høyde, bredde og areal for mannitol- og xylosetopp analysert med ulik flow-hastighet, NaOH-konsentrasjon og temperatur

Tabell 5.1: Oversikt over retensjonstid, høyde, bredde og areal for lactulose-toppen analysert med ulik flow-hastighet med PA20-kolonnen, og med NaOH-konsentrasjon på 30mM og temperatur på 30 °C.

Flow-rate (min/mL)	Retensjonstid (min)	Høyde (nC)	Bredde (min)	Areal (nC*min)
0,15	35,525	67,45	0,858	69,3824
0,2	26,584	72,98	0,667	57,5829
0,25	21,192	75,97	0,55	48,9493
0,3	17,65	78,3	0,47	42,5512

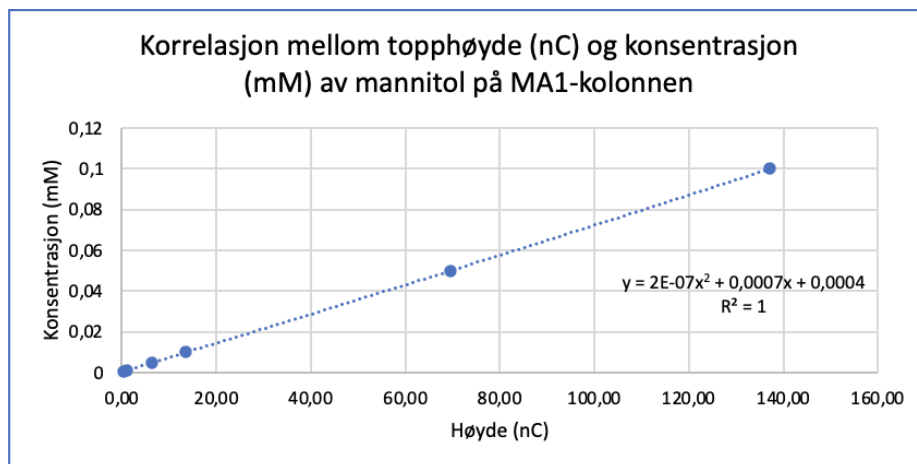
Tabell 5.2: Oversikt over retensjonstid, høyde, bredde og areal for lactulose-toppen analysert med ulik NaOH-konsentrasjon på PA20-kolonnen.

NaOH-konsentrasjon (nM)	Retensjonstid (min)	Høyde (nC)	Bredde (min)	Areal (nC*min)
20	32,467	52,070	0,790	44,545
25	29,325	60,400	0,710	46,367
30	26,350	71,190	0,644	50,205
35	23,900	84,380	0,606	52,934
40	21,825	91,170	0,540	53,596
45	20,050	104,450	0,507	59,103

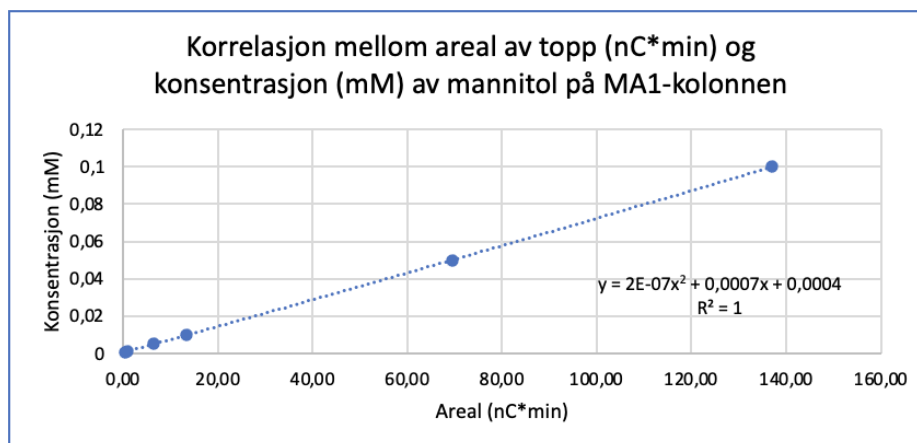
Tabell 5.3: Oversikt over retensjonstid, høyde, bredde og areal for lactulose-toppen analysert ved ulike temperaturer på PA20-kolonnen.

Temperatur (C)	Retensjonstid (min)	Høyde (nC)	Bredde (min)	Areal (nC*min)
20	31,867	41,63	0,827	37,5543
30	26,125	66,98	0,624	44,5682
40	22,45	73,59	0,553	48,7708

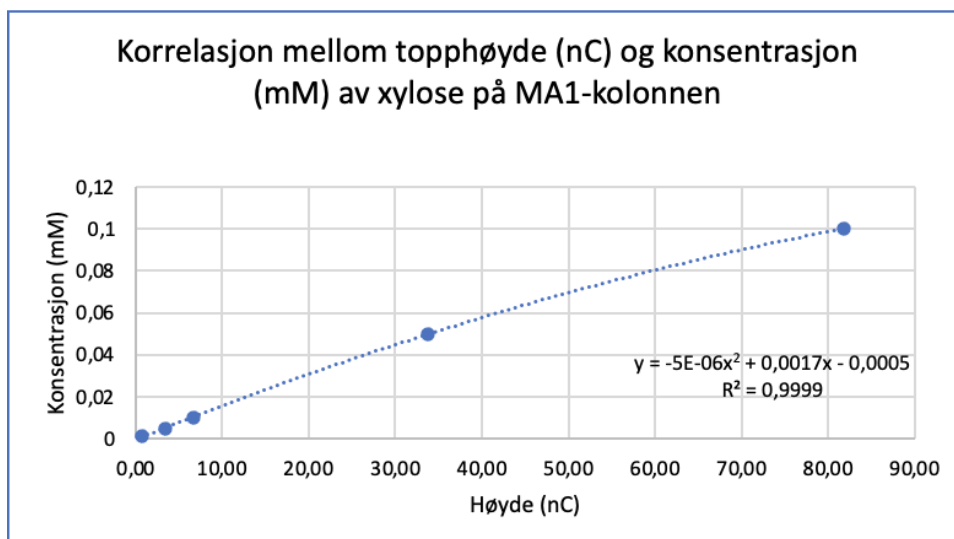
Vedlegg 6: Korrelasjon mellom konsentrasjon av sukkerartene og topphøyde og areal for standardløsningene



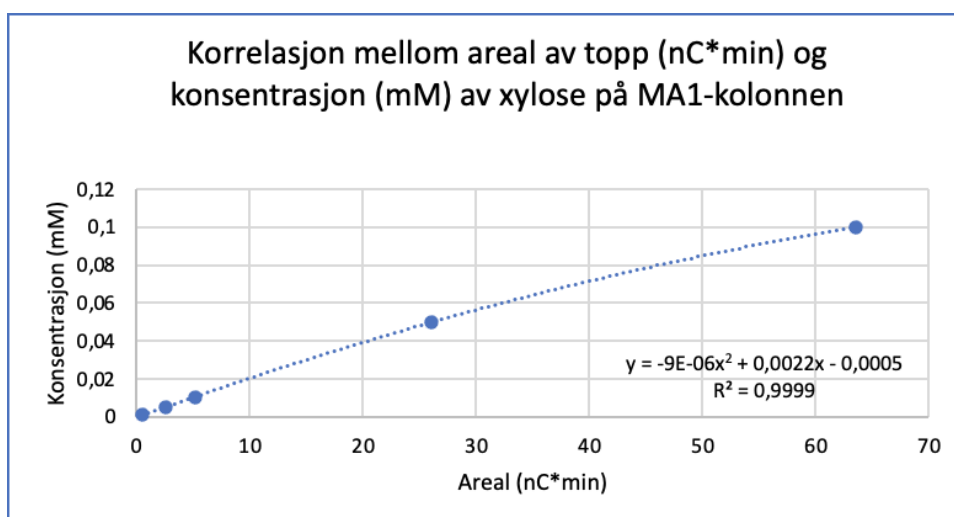
Figur 6.1: Grafen viser korrelasjonen mellom topphøyde (nC) og konsentrasjon (mM) av mannitol på MA1-kolonnen med 6 konsentrasjonsnivåer. R^2 er 1 med kvadratisk funksjon.



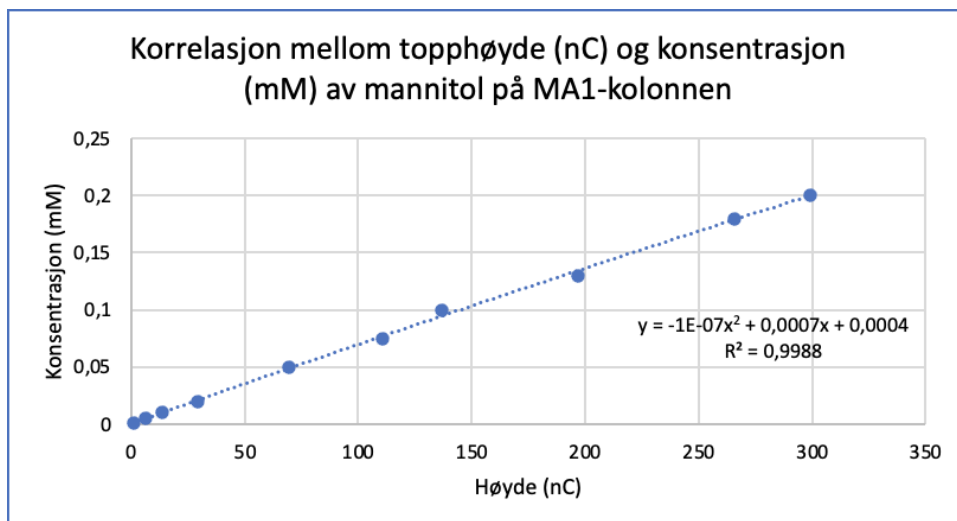
Figur 6.2: grafen viser korrelasjonen mellom areal(nC*min) av toppen og konsentrasjon(mM) av mannitol på MA1-kolonnen med 6 konsentrasjonsnivåer. R^2 er 1 med kvadratisk funksjon.



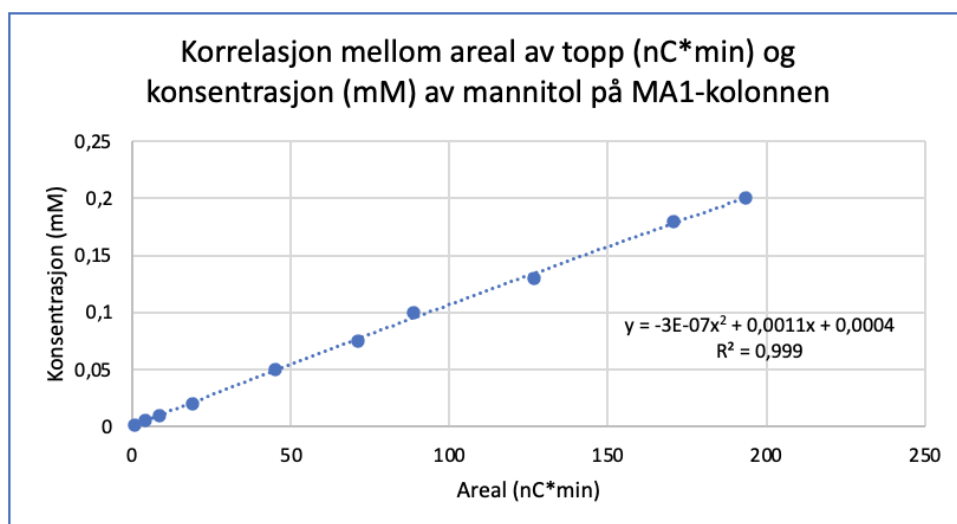
Figur 6.3: grafen viser korrelasjonen mellom topphøyde (nC) og konsentrasjon(mM) av xylose på MA1-kolonnen med 6 konsentrasjonsnivåer. R^2 er 0,9999 med kvadratisk funksjon.



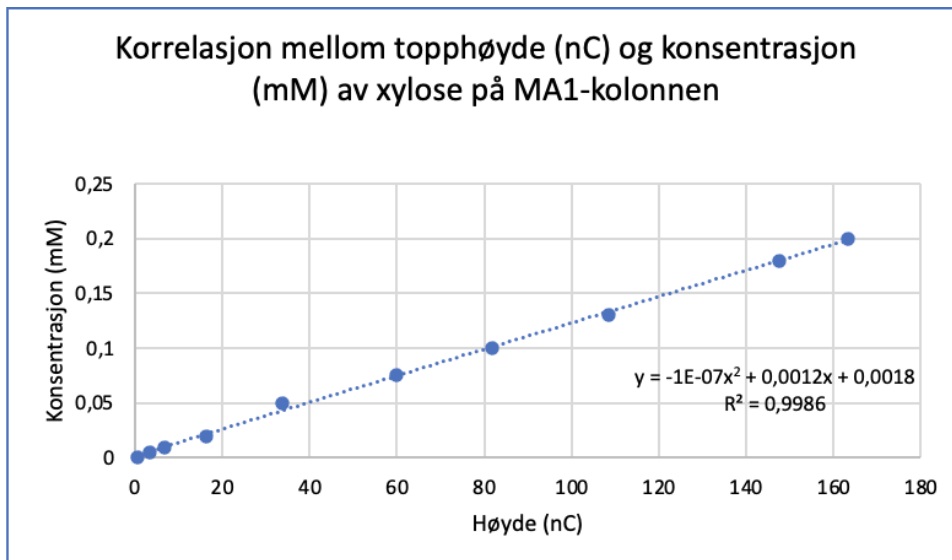
Figur 6.4: grafen viser grafen viser korrelasjonen mellom areal(nC*min) av toppen og konsentrasjon(mM) av mannitol på MA1-kolonnen med 6 konsentrasjonsnivåer. R^2 er 0,9999 med kvadratisk funksjon.



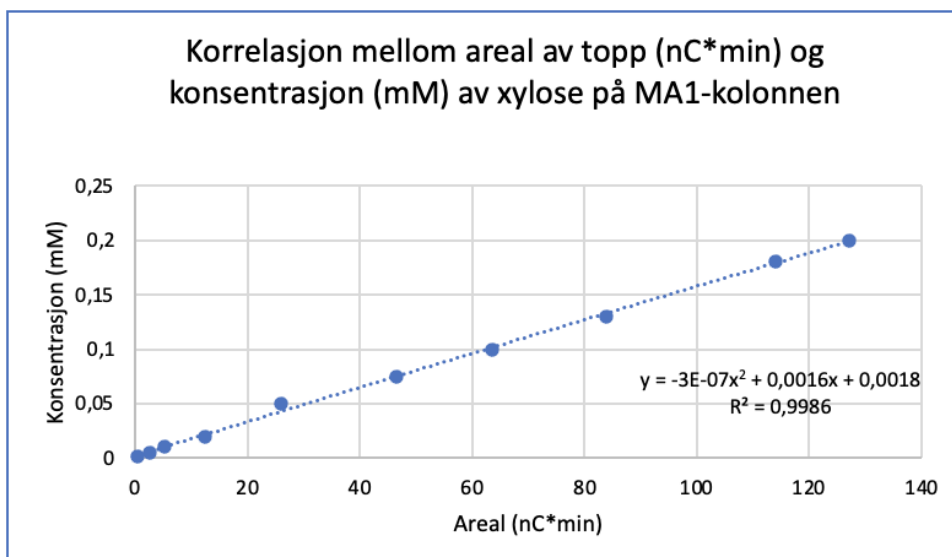
Figur 6.5: grafen viser korrelasjonen mellom topphøyde (nC) og konsentrasjon (mM) av mannitol på MA1-kolonnen med 10 nivåer. R^2 er 0,9988 med kvadratisk funksjon.



Figur 6.6: grafen viser korrelasjonen mellom areal(nC*min) av toppen og konsentrasjon(mM) av mannitol på MA1-kolonnen med 10 nivåer. R^2 er 0,999 med kvadratisk funksjon.



Figur 6.7: Grafen viser korrelasjonen mellom topphøyde (nC) og konsentrasjon (mM) av xylose på MA1-kolonnen med 10 nivåer. R^2 er 0,9986 med kvadratisk funksjon.



Figur 6.8: Grafen viser korrelasjonen mellom areal(nC*min) av toppen og konsentrasjon(mM) av xylose på MA1-kolonnen med 10 nivåer. R^2 er 0,9986 med kvadratisk funksjon.

Vedlegg 7: Konsentrasjon detektert av standardløsningene i kalibreringskurven

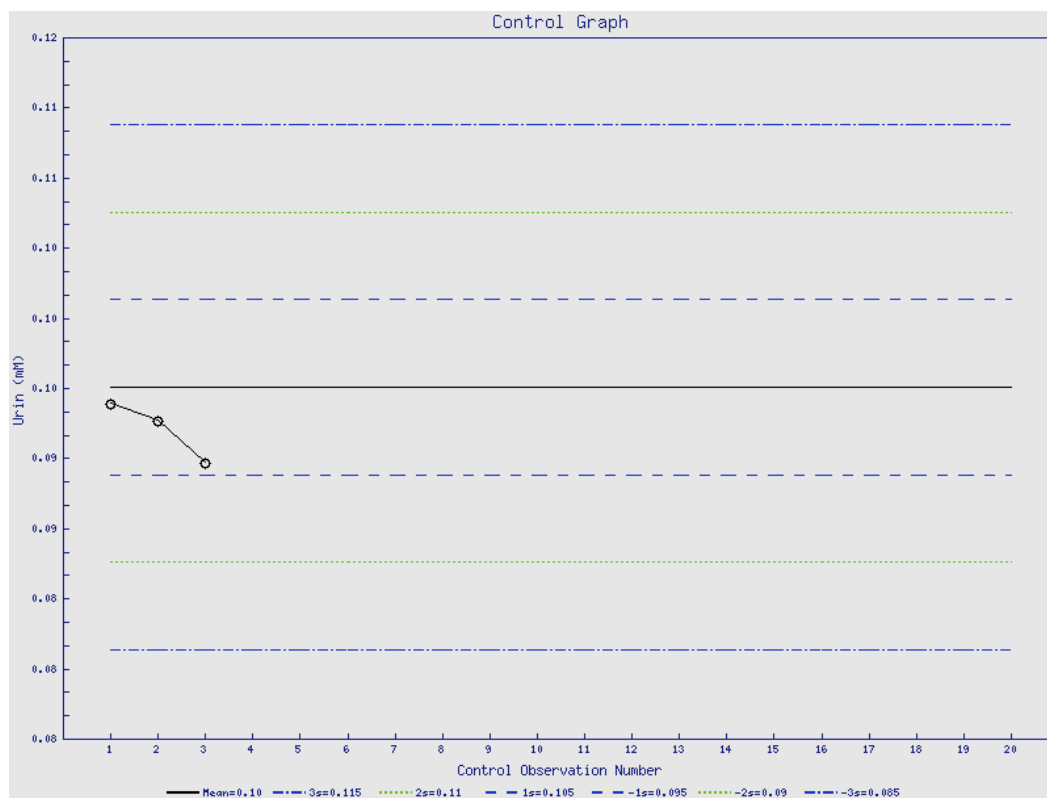
Calibration Results		Mannitol					
No.	Injection Name	Calibration Level	X Value ED_1 Mannitol	Y Value ED_1 Mannitol	Y Value ED_1 Mannitol	Area nC*min ED_1 Mannitol	Height nC ED_1 Mannitol
5	0,1 mM std	4	0,1000	88,6733	88,6733	88,673	137,080
6	0,05 mM std	6	0,0500	44,9749	44,9749	44,975	69,635
7	0,01 mM std	8	0,0100	8,6263	8,6263	8,626	13,406
8	0,005 mM std	9	0,0050	4,1152	4,1152	4,115	6,400
9	0,001 mM std	10	0,0010	0,5983	0,5983	0,598	0,965
27	0,2 mM std	1	0,2000	193,4509	193,4509	193,451	299,115
28	0,075 mM std	5	0,0750	71,3734	71,3734	71,373	110,894
29	0,02 mM std	7	0,0200	18,8728	18,8728	18,873	29,257
87	0,13 mM std	3	0,1300	126,6917	126,6917	126,692	197,080
88	0,18 mM std	2	0,1800	170,8149	170,8149	170,815	265,545

Tabell 7.1: Oversikt over standardløsningenes konsentrasjon (x-verdi), samt areal (nC*min,y-verdi) og høyde (nC) for mannitol-toppene.

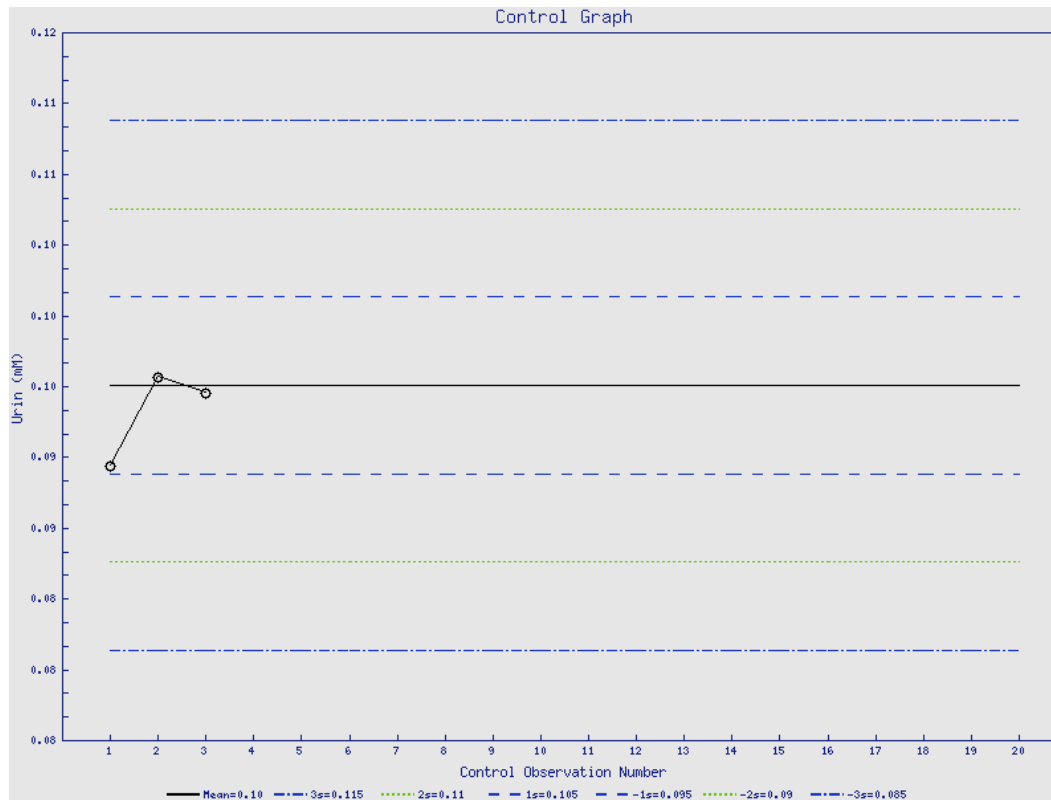
Tabell 7.2: Oversikt over standardløsningenes konsentrasjon (x-verdi), samt areal (nC*min,y-verdi) og høyde (nC) for xylose-toppene.

Calibration Results		Xylose					
No.	Injection Name	Calibration Level	X Value ED_1 Xylose	Y Value ED_1 Xylose	Y Value ED_1 Xylose	Area nC*min ED_1 Xylose	Height nC ED_1 Xylose
5	0,1 mM std	4	0,1000	63,5425	63,5425	63,542	81,778
6	0,05 mM std	6	0,0500	26,0876	26,0876	26,088	33,798
7	0,01 mM std	8	0,0100	5,1640	5,1640	5,164	6,743
8	0,005 mM std	9	0,0050	2,5750	2,5750	2,575	3,356
9	0,001 mM std	10	0,0010	0,4777	0,4777	0,478	0,649
27	0,2 mM std	1	0,2000	127,1394	127,1394	127,139	163,292
28	0,075 mM std	5	0,0750	46,4650	46,4650	46,465	59,871
29	0,02 mM std	7	0,0200	12,4864	12,4864	12,486	16,207
87	0,13 mM std	3	0,1300	83,8495	83,8495	83,849	108,514
88	0,18 mM std	2	0,1800	114,0860	114,0860	114,086	147,500

Vedlegg 8: Kontrollkort for syntetisk kontrollmateriale over tre dager



Figur 8.1: Kontrollkortet viser variasjon i detektert konsentrasjon av mannitol i syntetisk kontrollprøve over 3 dager.



Figur 8.2: Kontrollkort viser variasjon i detektert konsentrasjon av xylose i syntetisk kontrollprøve over 3 dager.

Vedlegg 9: Beregning av masse og prosent gjenfunnet mannitol i pasientprøver analysert med HPAE-PAD og MA1-kolonnen

Pasient	Tidspunkt	Fortynning	Diurese (ml)	Kons. (mmol)		SD (mmol)	%CV	Mannitol				
				Kons. 1 (mmol)	Kons. 2 (mmol)			Gj.snitt kons. (mmol)	mol	Masse (g)	Prosent gjenfunnet (%)	
A1	FU	500	719,9465	0,0032	0,0029	0,00021	7,0	0,0031	0,001098	0,2000	10,0	
A2	BL	500	664,8718	0,0042	0,0042	0,00000	0,0	0,0042	0,001396	0,2544	12,7	
B1	FU	500	800,1688	0,0034	0,0033	0,00007	2,1	0,0034	0,001340	0,2442	12,2	
B2	BL	500	617,8013	0,0060	0,0060	0,00000	0,0	0,0060	0,001853	0,3376	16,9	
C1	FU	500	1269,9643	0,0028	0,0029	0,00007	2,5	0,0029	0,001810	0,3297	16,5	
C2	BL	500	1067,1651	0,0025	0,0024	0,00007	2,9	0,0025	0,001307	0,2381	11,9	
D1	FU	500	558,2562	0,0060	0,0060	0,00000	0,0	0,0060	0,001675	0,3051	15,3	
D2	BL	500	907,9648	0,0053	0,0057	0,00028	5,1	0,0055	0,002497	0,4549	22,7	
E1	FU	500	1015,1635	0,0025	0,0026	0,00007	2,8	0,0026	0,001294	0,2358	11,8	
E2	BL	500	355,7044	0,0059	0,0059	0,00000	0,0	0,0059	0,001049	0,1912	9,6	
F1	FU	1000	222,4004	0,0045	0,0045	0,00000	0,0	0,0045	0,001001	0,1823	9,1	
F2	BL	1000	316,8811	0,0033	0,0033	0,00000	0,0	0,0033	0,001046	0,1905	9,5	
G1	FU	1000	177,1609	0,0050	0,0049	0,00007	1,4	0,0050	0,000877	0,1598	8,0	
G2	BL	2000	171,6286	0,0026	0,0026	0,00000	0,0	0,0026	0,000892	0,1626	8,1	
H1	BL	500	655,3557	0,0060	0,0059	0,00007	1,2	0,0060	0,001950	0,3552	17,8	
H2	FU	500	414,2172	0,0067	0,0064	0,00021	3,2	0,0066	0,001357	0,2471	12,4	
I1	BL	500	709,8300	0,0034	0,0034	0,00000	0,0	0,0034	0,001207	0,2198	11,0	
I2	FU	500	637,6087	0,0058	0,0057	0,00007	1,2	0,0058	0,001833	0,3339	16,7	
J1	BL	500	1130,7959	0,0034	0,0033	0,00007	2,1	0,0034	0,001894	0,3450	17,3	
J2	FU	500	768,6600	0,0044	0,0043	0,00007	1,6	0,0044	0,001672	0,3046	15,2	
K1	FU	500	596,4613	0,0054	0,0053	0,00007	1,3	0,0054	0,001596	0,2907	14,5	
K2	BL	1000	247,4796	0,0044	0,0043	0,00007	1,6	0,0044	0,001077	0,1961	9,8	
L1	FU	500	634,1964	0,0034	0,0034	0,00000	0,0	0,0034	0,001078	0,1964	9,8	
L2	BL	1000	458,5813	0,0011	0,0011	0,00000	0,0	0,0011	0,000504	0,0919	4,6	
M1	FU	500	767,0770	0,0047	0,0048	0,00007	1,5	0,0048	0,001822	0,3319	16,6	
M2	BL	500	649,2426	0,0038	0,0039	0,00007	1,8	0,0039	0,001250	0,2277	11,4	
N1	BL	500	588,3333	0,0083	0,0085	0,00014	1,7	0,0084	0,002471	0,4501	22,5	
N2	FU	500	524,5472	0,0105	0,0105	0,00000	0,0	0,0105	0,002754	0,5017	25,1	

Vedlegg 10: Beregning av masse og prosent gjenfunnet xylose i pasientprøver analysert med HPAE-PAD og MA1-kolonnen

Pasient	Tidspunkt	Fortyning	Diurese (mL)	Kons. 1 (mM)	Kons. 2 (mM)	SD (mM)	%CV	Gj.snitt kons. (mM)	mol	Masse (g)	Prosent gjenfunnet (%)
A1	FU	500	719,9465	0,0865	0,0654	0,0149	19,6	0,0760	0,027340	4,1045	20,5
A2	BL	500	664,8718	0,1183	0,1162	0,0015	1,3	0,1173	0,038978	5,8518	29,3
B1	FU	500	800,1688	0,1101	0,1047	0,0038	3,6	0,1074	0,042969	6,4509	32,3
B2	BL	500	617,8013	0,1484	0,1482	0,0001	0,1	0,1483	0,045810	6,8775	34,4
C1	FU	500	1269,9643	0,0667	0,0682	0,0011	1,6	0,0675	0,042830	6,4300	32,1
C2	BL	500	1067,1651	0,0657	0,0616	0,0029	4,6	0,0637	0,033963	5,0988	25,5
D1	FU	500	558,2562	0,1258	0,1260	0,0001	0,1	0,1259	0,035142	5,2759	26,4
D2	BL	500	907,9648	0,1031	0,1102	0,0050	4,7	0,1067	0,048417	7,2689	36,3
E1	FU	500	1015,1635	0,0660	0,0671	0,0008	1,2	0,0666	0,033780	5,0713	25,4
E2	BL	500	355,7044	0,1348	0,1334	0,0010	0,7	0,1341	0,023850	3,5806	17,9
F1	FU	1000	222,4004	0,1657	0,1670	0,0009	0,6	0,1664	0,036996	5,5543	27,8
F2	BL	1000	316,8811	0,1207	0,1196	0,0008	0,6	0,1202	0,038073	5,7159	28,6
G1	FU	1000	177,1609	0,1096	0,1071	0,0018	1,6	0,1084	0,019195	2,8818	14,4
G2	BL	2000	171,6286	0,0634	0,0627	0,0005	0,8	0,0631	0,021642	3,2492	16,2
H1	BL	500	655,3357	0,1340	0,1321	0,0013	1,0	0,1331	0,043596	6,5451	32,7
H2	FU	500	414,2172	0,1806	0,1736	0,0049	2,8	0,1771	0,036679	5,5066	27,5
I1	BL	500	709,8300	0,0850	0,0841	0,0006	0,8	0,0846	0,030008	4,5051	22,5
I2	FU	500	637,6087	0,1183	0,1186	0,0002	0,2	0,1185	0,037762	5,6693	28,3
J1	BL	500	1130,7959	0,0744	0,0743	0,0001	0,1	0,0744	0,042037	6,3111	31,6
J2	FU	500	768,6600	0,1088	0,1080	0,0006	0,5	0,1084	0,041661	6,2546	31,3
K1	FU	500	596,4613	0,1567	0,1537	0,0021	1,4	0,1552	0,046285	6,9488	34,7
K2	BL	1000	247,4796	0,1259	0,1227	0,0023	1,8	0,1243	0,030762	4,6183	23,1
L1	FU	500	634,1964	0,0927	0,0912	0,0011	1,2	0,0920	0,029157	4,3774	21,9
L2	BL	1000	458,5813	0,0359	0,0349	0,0007	2,0	0,0354	0,016234	2,4372	12,2
M1	FU	500	767,0770	0,1513	0,1530	0,0012	0,8	0,1522	0,058355	8,7609	43,8
M2	BL	500	649,2426	0,1320	0,1371	0,0036	2,7	0,1346	0,043678	6,5573	32,8
N1	BL	500	588,3333	0,1805	0,1833	0,0020	1,1	0,1819	0,053509	8,0333	40,2
N2	FU	500	524,5472	0,2202	0,2205	0,0002	0,1	0,2204	0,057792	8,6763	43,4