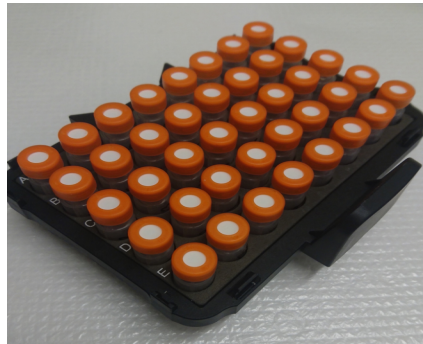


MASTEROPPGAVE
Masterstudium i biomedisin
Mai 2018

Optimalisering av en høytrykk væskrokromatografi (HPLC)-metode for kvantifisering av vitamin B₂ i plasma og fullblod. Har pasienter med kronisk nyresykdom endret vitamin B₂- og vitamin B₆-status i plasma?



av
Gunn Hilde Glamsland

Fakultet for helsefag
Institutt for naturvitenskapelige helsefag

OsloMet – storbyuniversitetet

Optimalisering av en høytrykk væskechromatografi (HPLC)-metode for kvantifisering av vitamin B₂ i plasma og fullblod. Har pasienter med kronisk nyresykdom endret vitamin B₂- og vitamin B₆-status i plasma?

av

Gunn Hilde Glamsland

Masterstudium i biomedisin, 60 sp

OsloMet – storbyuniversitetet

Fakultet for helsefag

Institutt for naturvitenskapelige helsefag

Utført ved Universitet i Agder (UiA), Fakultet for teknologi og realfag, Kristiansand

Veileder: Mohammad Azam Mansoor

Mai 2018

OsloMet – storbyuniversitetet



UNIVERSITETET I AGDER

Forord

Arbeidet med min masteroppgave ble utført ved Fakultet for teknologi og realfag, Universitet i Agder avdeling Kristiansand, i perioden august 2017 til mai 2018.

Et spennende og lærerikt år med mange opp- og nedturer er snart over. Først av alt vil jeg rette en stor takk til min veileder, professor Mohammad Azam Mansoor, for all hjelp, støtte, tålmodighet og forståelse. Den genuine interessen og kunnskapen han har innen temaet har gitt meg enormt mye motivasjon underveis, og han har alltid gjort sitt ytterste for å bistå meg når det har vært nødvendig. Samtidig har han utfordret meg til å tenke og forsøke selv, noe som har gitt meg en bratt læringskurve og bidratt til en dypere forståelse for feltet jeg har arbeidet innen. Jeg vil også takke ingeniør Per Eikeset Knudsen for uvurderlig hjelp med laboratorieutstyr og diverse tekniske utfordringer.

En stor takk til venner og familie for at dere alltid har troen på meg og heier på meg. Takk for at døren deres alltid står åpen og at jeg har fått dele både glede og frustrasjon med dere. Jeg hadde ikke kommet like helskinnet ut av dette uten dere, og jeg er evig takknemlig.

I løpet av det siste året har jeg ikke bare tilegnet meg kunnskap rundt oppgavetemaet, men også lært mye om meg selv som menneske. Jeg har blitt mer nysgjerrig, selvstendig og kritisk. Jeg har lært at den eneste måten å takle motgang, er med desto mer pågangsmot og nysgjerrighet. Som min veileder så fint sa da det strittet imot som verst: «Det er dette som er forskning!»

Kristiansand, mai 2018

Gunn Hilde Glamsland

Sammendrag

Vitamin B₂ er en samlebetegnelse for riboflavin og dets koenzymformer FAD og FMN. FAD og FMN bidrar i en rekke redoksreaksjoner og er blant annet involvert i ATP-produksjonen i metabolismen av karbohydrater og lipider. FAD er essensiell ved remetylering av homocystein til metionin i sin rolle som koenzym for 5,10-metylentetrahydrofolat reduktase (MTHFR). I tillegg fungerer FAD som koenzym for glutation reduktase (GR), som reduserer glutation disulfid (GSSG) til glutation (GSH). GSH er en av kroppens viktigste antioksidanter og inneholder aminosyren cystein som er begrensende faktor. FMN er koenzym for pyridoksin-5'-fosfat oksidase (PNPO), som katalyserer dannelsen av den aktive formen for vitamin B₆; pyridoksal-5'-fosfat (PLP). PLP fungerer som koenzym i omsetningen av aminosyrer og karbohydrater, deriblant i omdannelsen av homocystein til cystein. 4-pyridoksinsyre (4-PA) er et avfallsprodukt i metabolismen av vitamin B₆, og skilles ut i urinen.

Hos pasienter med kronisk nyresykdom sees ofte et forhøyet nivå av homocystein i plasma, samt økt grad av oksidativt stress. Vitamin B₂ og B₆ er essensielle for metabolismen av homocystein og bekjempelse av oksidativt stress, men det foreligger lite kunnskap om vitamin-nivåene hos pasienter med nyresykdom. Målet med oppgaven var å undersøke konsentrasjonen av FAD, FMN og riboflavin i plasma og fullblod, samt PLP og 4-PA i plasma hos pasienter med kronisk nyresykdom (n = 112) og friske personer (n = 86) ved hjelp av HPLC-FLD. I tillegg ble en HPLC-metode optimalisert for måling og sammenlikning av vitamin B₂-nivåer i plasma og fullblod.

Metoden for kvantifisering av B₂-vitaminene er enkel, rask og viser god presisjon.

Pasientgruppen hadde signifikant høyere nivå av riboflavin i både plasma (p = 0.036) og fullblod (p = 0.025) sammenliknet med kontrollgruppen. I tillegg var nivået av 4-PA i plasma signifikant forhøyet i pasientgruppen sammenliknet med kontrollgruppen (p < 0.001). En mulig årsak til økt nivå av riboflavin er endret metabolisme av vitamin B₂ hos pasienter med nyresykdom, mens forhøyet nivå av 4-PA kan skyldes nedsatt ekskresjon eller økt nedbrytning av vitamin B₆.

Abstract

Vitamin B₂ is a generic term including riboflavin and its coenzyme forms FAD and FMN. FAD and FMN contribute in a number of redox reactions and are, among others, involved in ATP-production in the metabolism of carbohydrates and lipids. FAD is essential for remethylation of homocysteine to methionine in its role as a coenzyme for 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). In addition, FAD is a coenzyme for glutathione reductase (GR), which reduces glutathione disulfide (GSSG) to glutathione (GSH). GSH is among the most important antioxidants in the human body and contains the amino acid cysteine, which is the limiting factor. FMN acts as a coenzyme for pyridoxine-5'-phosphate oxidase (PNPO), which catalyzes the formation of the active form of vitamin B₆; pyridoxal-5'-phosphate (PLP). PLP acts as a coenzyme in the metabolism of amino acids and carbohydrates, including the conversion of homocysteine to cysteine. 4-pyridoxic acid is a waste product from the metabolism of vitamin B₆ and is excreted in the urine.

An increased level of plasma homocysteine and increased oxidative stress is often observed in patients with chronic kidney disease. Vitamin B₂ and B₆ are essential for the metabolism of homocysteine and for reducing oxidative stress, but the knowledge of these vitamin levels in patients with kidney disease is limited. The aim of this study was to investigate the plasma and whole blood levels of FAD, FMN and riboflavin as well as the plasma levels of PLP and 4-PA in patients with chronic kidney disease (n = 112) and in healthy subjects (n = 86) by HPLC-FLD. Furthermore, an HPLC method was optimized for the measurement and comparison of vitamin B₂ in plasma and whole blood.

The method for quantification of the B₂ vitamers is simple, efficient and has shown good precision. The patient group had a significantly higher level of riboflavin both in plasma (p = 0.036) and in whole blood (p = 0.025) compared to the control group. In addition, the level of plasma 4-PA was significantly higher in the patient group compared to the control group (p < 0.001). A possible cause of increased levels of riboflavin is altered vitamin B₂ metabolism in renal disease patients, while elevated levels of 4-PA in plasma may be due to decreased excretion or increased degradation of vitamin B₆.

Liste med forkortelser

4-PA	4-pyridoksinsyre
ACAD	Acyl-CoA dehydrogenaser
ACN	Acetonitril
ADPKD	Autosomal dominant polycystisk nyresykdom
ATP	Adenosintrifosfat
CBS	Cystationin beta-syntase
CE-LIF	Capillary electrophoresis laser-induced fluorescence detection
CH ₃ COONa	Natriumacetat
CL	Cystationin lyase
CV	Coefficient of variation (variasjonskoeffisient)
ddH ₂ O	Dobbeltdestillert vann
DNA	Deoksyribonukleinsyre
EGRAC	Erythrocyte glutathione reductase activation coefficient
FAD	Flavin adenin dinukleotid
FADH ₂	Flavin adenin dinukleotid, redusert form
FLD	Fluorescensdetektor
FMN	Flavin mononukleotid
GCS	Gamma-glutamylcystein syntetase
GPx	Glutation peroksidase
GR	Glutation reduktase
GSH	Glutation
GSS	Glutation syntetase
GSSG	Glutation disulfid
H ₂ O	Vann
H ₃ PO ₄	Fosforsyre
Hcy	Homocystein
HPLC	High performance liquid chromatography
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenfosfat
LC-MS/MS	Liquid chromatography– tandem mass spectrometry
MS	Metionin syntase

MTHFR	5,10-metylentetrahydrofolat reduktase
NaCl	Natriumklorid
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat
O ₂	Oksygen
PKD	Polycystisk nyresykdom
PL	Pyridoksal
PLP	Pyridoksal-5`-fosfat
PM	Pyridoksamin
PMP	Pyridoksamin-5`-fosfat
PN	Pyridoksin
PNP	Pyridoksin-5`-fosfat
PNPO	Pyridoksin-5´-fosfat oksidase
REK	Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk
RF	Riboflavin
ROS	Reactive oxygen species (reaktive oksygenforbindelser)
RNA	Ribonukleinsyre
rpm	Rounds per minute (omdreininger per minutt)
SD	Standard deviation (standardavvik)
SDH	Succinate dehydrogenase
SOD	Superoksid dismutase
SPE	Solid-phase extraction (solid-fase ekstraksjon)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TCA	Trikloreddiksyre
UV	Ultraviolet (ultrafiolett)

Innholdsfortegnelse

Forord	II
Sammendrag	III
Abstract.....	IV
Liste med forkortelser.....	V
1. Innledning.....	1
1.1 B-vitaminer	1
1.1.1 Riboflavin (vitamin B ₂).....	1
1.1.2 Pyridoksin (Vitamin B ₆).....	6
1.2 Frie radikaler og oksidativt stress.....	10
1.2.1 Antioksidantforsvar.....	11
1.3 Nyresykdom	13
1.3.1 Arvelig polycystisk nyresykdom	13
1.3.2 IgA-nefritt	14
1.3.3 Nyresykdom og oksidativt stress	14
1.4 Høytrykk væskrokromatografi (HPLC).....	15
1.4.1 Metodeprinsipp	16
1.4.2 Opprettelse av standardkurve	17
1.4.3 HPLC-detektorer	18
2. Formål med oppgaven	19
3. Materialer og metoder.....	20
3.1 Deltakere til prosjektet og prøveinnsamling.....	20
3.2 HPLC-systemet	21
3.3 Vitamin B ₂	22
3.3.1 Reagenser og standardløsninger	22
3.3.2 Oppstart av HPLC-instrumentet og optimalisering av metode.....	22
3.3.3 Proteinpresipitering	23
3.3.3.1 Plasma.....	23
3.3.3.2 Fullblod	24
3.3.4 Standardkurve og linearitet.....	24
3.3.5 Nedre målegrense.....	25
3.3.6 Variasjonskoeffisient (CV).....	25
3.3.7 Recovery assay.....	26
3.3.8 Prøver fra prosjektdeltakere.....	27
3.4 Vitamin B ₆	28
3.4.1 Reagenser og standardløsninger	28
3.4.2 Oppstart av HPLC-instrumentet.....	28
3.4.3 Proteinpresipitering	29
3.4.3.1 Plasma.....	29
3.4.3.2 Fullblod	29
3.4.4 Standardkurve og linearitet.....	30
3.4.5 Variasjonskoeffisient (CV).....	30
3.4.6 Prøver fra prosjektdeltakere.....	30
3.5 Statistiske metoder	31

4. Resultater	32
4.1 Kromatogrammer	32
4.2 Standardkurve og linearitet	34
4.3 Nedre målegrense	35
4.4 Variasjonskoeffisient (CV)	36
4.5 Recovery assay	37
4.6 Prøver fra prosjektdeltakere	38
5. Diskusjon	42
5.1 Vitamin B ₂	42
5.1.1 Optimalisering av metode	42
5.1.1.1 Proteinpresipitering i plasma	42
5.1.1.2 HPLC-analyse	42
5.1.2 Standardkurve og linearitet	44
5.1.3 Nedre målegrense	45
5.1.4 Variasjonskoeffisient (CV)	45
5.1.5 Recovery assay	46
5.1.6 Prøver fra prosjektdeltakere	49
5.1.6.1 Sammenlikning av nivåer i plasma og fullblod	51
5.2 Vitamin B ₆	53
5.2.1 Standardkurve og linearitet	53
5.2.2 Variasjonskoeffisient	53
5.2.3 Prøver fra prosjektdeltakere	53
5.3 Potensielle feilkilder og utfordringer generelt	55
5.4 Konklusjon	56
Litteraturliste	57
Vedlegg	61
Vedlegg 1: REK-godkjenning	61
Vedlegg 2: Rådata HPLC-resultater	63

1. Innledning

1.1 B-vitaminer

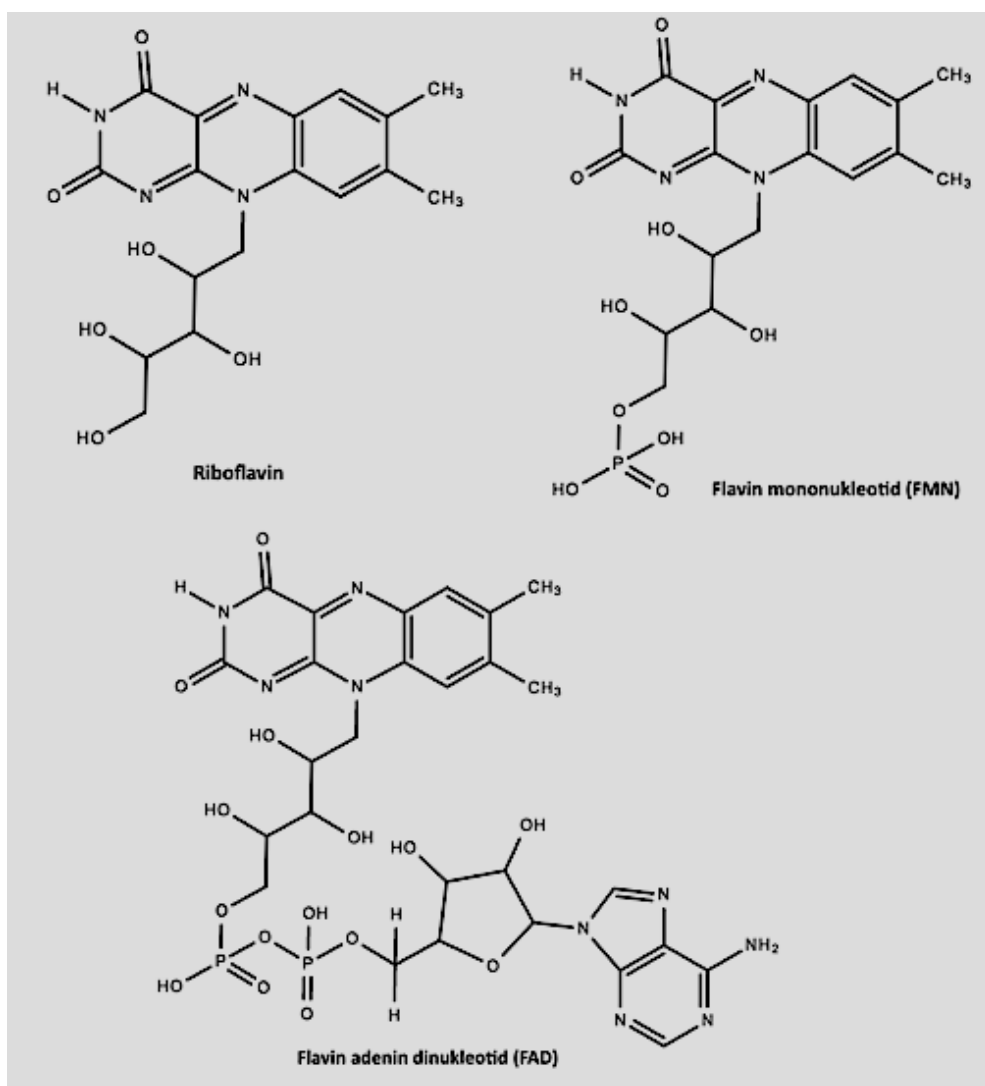
Vitaminer er en samlebetegnelse på ulike mikronæringsstoffer med svært spesifikke funksjoner som kreves i en rekke fysiologiske funksjoner essensielle for liv (1). Blant dem er B-vitaminer, vannløselige forbindelser som deles inn i åtte undergrupper; vitamin B₁ (tiamin), vitamin B₂ (riboflavin), niacin (vitamin B₃), pantotensyre (vitamin B₅), vitamin B₆ (pyridoksin), biotin (vitamin B₇/B₈), folat (vitamin B₉) og vitamin B₁₂ (kobalamin) (2). Den primære funksjonen til B-vitaminene er å hjelpe kroppens celler med produksjon av energi gjennom metabolismen av karbohydrater, fett og proteiner. I tillegg er mikronæringsstoffene viktige for hjernefunksjonen (3).

B-vitaminer fungerer som koenzym og inngår i en rekke biokjemiske reaksjoner i kroppen. Folat, vitamin B₁₂ og vitamin B₆ er forsket mye på de siste tiårene, særlig i sammenheng med utvikling av hjerte-karsykdommer. Disse vitaminene er blant annet involvert i metabolismen av aminosyren homocystein, som ved forhøyede nivåer i plasma er kjent for å øke risikoen for utvikling av hjerte-karsykdom (2).

1.1.1 Riboflavin (vitamin B₂)

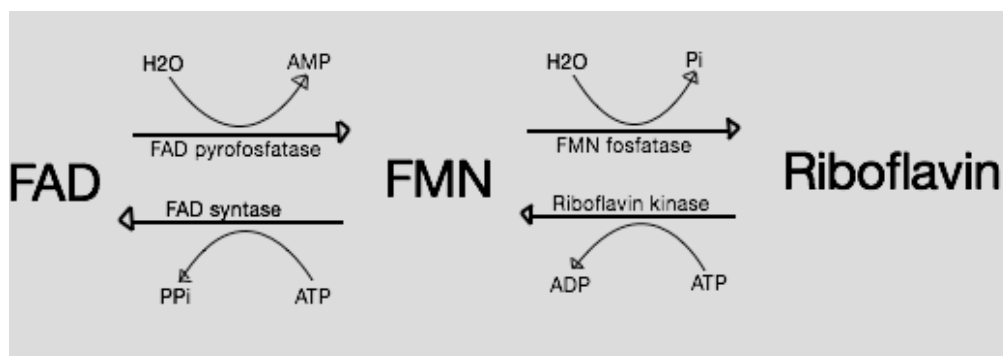
Riboflavin, først kjent under navnet vitamin B₂, ble identifisert på begynnelsen av 1900-tallet og er et essensielt, vannløselig vitamin (4). Navnet riboflavin kommer av sidekjeden ribitol som er en sukkeralkohol, og det latinske ordet *flavus* som betyr gul, da riboflavin har gul farge og er naturlig fluorescerende (5). Vitaminet er en organisk forbindelse og inneholder en karakteristisk flavin-ring konjugert til to metylgrupper, i tillegg til ribitol-gruppen (figur 1). Flaviner kjennetegnes ved at de har evnen til å oksideres og reduseres. Evnen til å overføre både elektroner, hydrogenatomer og hydridioner gjør riboflavin utsatt for fotooksidasjon, som kan føre til dannelse av frie radikaler og reaktive oksygenforbindelser (4, 5).

Riboflavin er essensiell for den intermediære metabolismen av karbohydrater, aminosyrer og lipider (1). Fritt riboflavin forekommer sjeldent, og eksisterer stort sett i form av derivatene flavin adenin dinukleotid (FAD) og flavin mononukleotid (FMN) (figur 1) (5). FMN og FAD er de metabolsk aktive formene for riboflavin og fungerer som koenzym involvert i en rekke redoksreaksjoner i kroppens energiomsetning (1). I tillegg er koenzymene essensielle for aktivering av blant annet folat og vitamin B₆, fungerer som signaltransdusere i programmert celledød, bidrar til reparasjon av DNA-skade og har antioksidant-egenskaper (4, 5).



Figur 1: Kjemisk struktur til riboflavin, FMN og FAD.

Da riboflavin er vannløselig, må mikronæringsstoffet inntas jevnlig gjennom kosten. De viktigste kildene er melkeprodukter, egg og kjøtt, og absorpsjon skjer i tynntarmen. Inntak av vitaminet inkluderer både fritt riboflavin og flavoproteiner bundet til FAD eller FMN, hovedsakelig sistnevnte. FAD og FMN frigis fra bærerproteinene under fordøyelsen, og hydrolyseres deretter til riboflavin ved hjelp av spesifikke fosfataser før absorpsjon i enterocytene. Hydrolysen av FMN til riboflavin skjer i ett trinn mens hydrolysen av FAD skjer i to trinn, via FMN (figur 2) (1, 5).

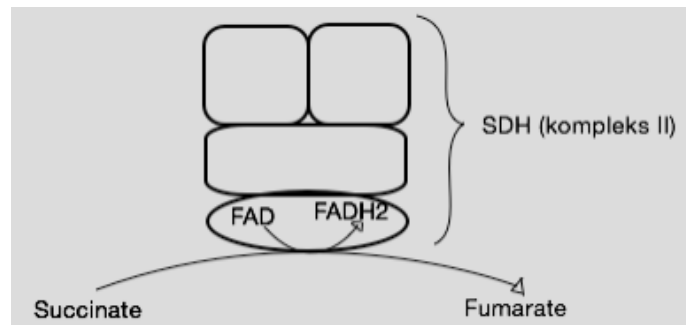


Figur 2: FAD og FMN hydrolyseres til riboflavin i tynntarmen ved hjelp av spesifikke fosfataser. Riboflavin absorberes i enterocytene, hvor noe fosforyleres til FMN og FAD. Riboflavin fraktes via plasma til ulike vev før fosforylering til FMN og FAD (1, 5).

I enterocytene fosforyleres noe fritt riboflavin til FMN, før både fritt riboflavin og FMN entrer sirkulasjonen. I plasma er forbindelsene hovedsakelig bundet til plasmaproteiner som albumin, fibrinogen og enkelte immunoglobuliner. Kun fritt riboflavin tas opp i cellene i ulike vev, og fosforyleres deretter til FAD og FMN som bindes til spesifikke flavoproteiner. Høyest konsentrasjon av vitaminet er funnet i lever, nyrer og hjerte (1, 4-6). I tillegg til absorpsjon fra mat bidrar naturlig forekommende bakterier i tykktarmen til å opprettholde nivået av riboflavin ved endogen syntese (6, 7). Nyrene sørger for utskillelse av overflødig riboflavin gjennom urinen for å opprettholde den fysiologiske homeostasen (1).

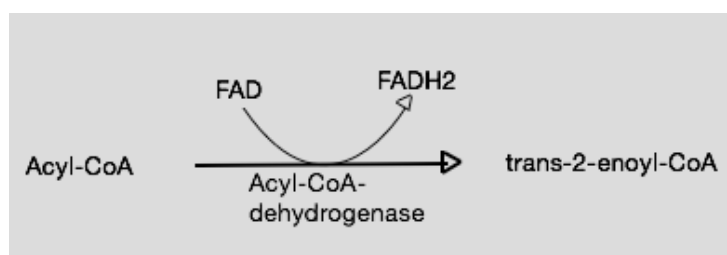
FMN og FAD fungerer som intermediater i overføringen av elektroner i en rekke biologiske redoksreaksjoner. Enzymene som binder FAD og FMN kalles flavoproteiner/flavoenzymmer og er enten oksidaser eller dehydrogenaser. Eksempler på viktige flavoproteiner er succinate dehydrogenase (SDH) og acyl-CoA dehydrogenaser (ACAD), som avhenger av FAD som koenzym (1). SDH er et enzymkompleks bestående av fire subenheter som utgjør kompleks II

i den mitokondrielle elektrontransportkjeden, og i tillegg deltar i Krebs syklus. SDH er kovalent bundet til FAD og katalyserer oksidasjonen av succinate til fumarate i Krebs syklus, ved samtidig reduksjon av FAD til FADH₂ (figur 3). Elektronene fra FADH₂ benyttes i elektrontransportkjeden for generering av ATP (8).



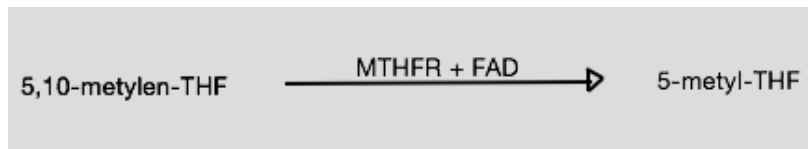
Figur 3: Succinate dehydrogenase (SDH)-komplekset bundet til FAD. Komplekset katalyserer oksidasjonen av succinate til fumarate i Krebs syklus ved samtidig reduksjon av FAD til FADH₂.

ACAD omfatter en stor gruppe FAD-avhengige enzymer som deltar i metabolismen av aminosyrer og fettsyrer. Mitokondriell β -oksidasjon av fettsyrer er en viktig kilde til ATP ved fravær av glukose, for eksempel ved faste. Fettsyrene omdannes først til acyl-CoA i cellenes cytosol, før acyl-CoA oksideres ved karbon β (C³) og danner trans-2-enoyl-CoA (figur 4). Reaksjonen foregår i matriks i mitokondriene og katalyseres av enzymet acyl-CoA dehydrogenase med FAD som koenzym. FAD reduseres til FADH₂, og elektronene fra redoksreaksjonen benyttes i elektrontransportkjeden til å generere ATP (7).



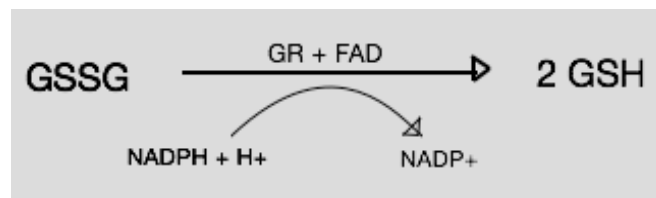
Figur 4: Oksidasjon av acyl-CoA til trans-2-enoyl-CoA. Redoksreaksjonen er katalysert av acyl-CoA dehydrogenase med FAD som koenzym.

FAD er også sentral i metabolismen av homocystein i sin rolle som koenzym for enzymet 5,10-metyltetrahydrofolat reduktase (MTHFR). MTHFR katalyserer omdannelsen av 5,10-metyltetrahydrofolat til 5-metyltetrahydrofolat, som er den aktive formen for folat (figur 5). 5-metyltetrahydrofolat er nødvendig for remetylering av homocystein til metionin (9-11).



Figur 5: β -oksidasjon av fettsyrer; omdannelse av 5,10-metylentetrahydrofolat til 5-metyltetrahydrofolat. Reaksjonen katalyseres av enzymet MTHFR med FAD som koenzym.

Riboflavin innehar antioksidantegenskaper og er blant annet essensiell i glutatjon redoks-syklusen (12). Flavoproteiner bidrar til å opprettholde intracellulære nivåer av redusert glutatjon (GSH) via enzymet glutatjon reduktase (GR), som avhenger av FAD som koenzym (figur 6) (1). Mer om glutatjon redoks-syklusen i kapittel 1.2.1.



Figur 6: Reduksjon av glutatjon disulfid (GSSG) til glutatjon (GSH) katalyseres av glutatjon reduktase (GR) med FAD som koenzym, i nærvær av $\text{NADPH} + \text{H}^+$.

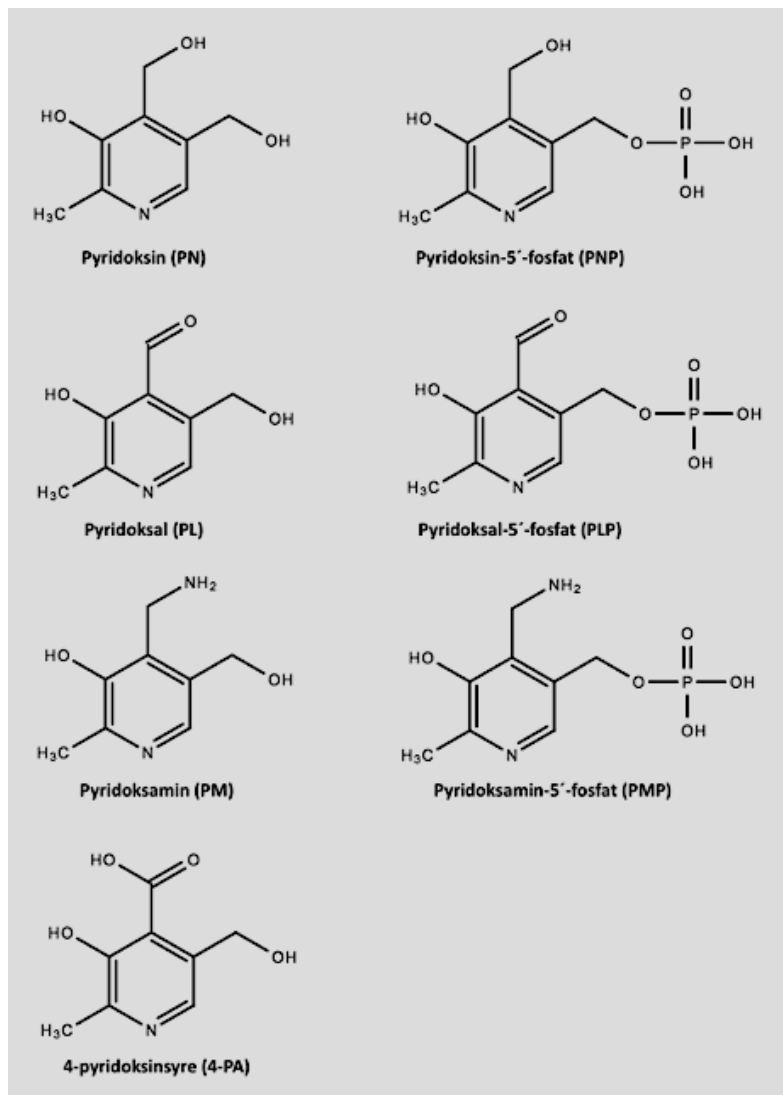
I tillegg foreligger det indikasjoner på at riboflavin kan fungere som en antioksidant alene. En mulig mekanisme er nøytralisering av hydrogenperoksid ved samtidig omdannelse av redusert riboflavin til sin oksiderte form. Dette er for øvrig temaer som krever videre forskning i form av observasjonsstudier og intervensjonsstudier, da de fleste undersøkelser per i dag er begrenset til eksperimentelle forsøk (12).

Riboflavin er ett av de mest stabile vitaminene ved lav pH, men degraderes raskt ved høy pH. Vitaminet er svært utsatt for fotodegradering, og må beskyttes mot lys.

Det har blitt rapportert konsentrasjonsnivåer av FAD, FMN og riboflavin i plasma hos friske personer ved CE-LIF på henholdsvis 74.0 (56.0–97.0) nmol/L, 6.6 (4.0–11.7) nmol/L og 10.5 (5.4–28.4) nmol/L (median (10.–90. persentil)) i følge Hustad et al. (13). Mangel på riboflavin kan blant annet gi nevrologiske lidelser, anemi, hemmet vekst og abnormaliteter i huden. Alvorlig mangel kan i tillegg påvirke nivået av vitamin B₆ (1, 5).

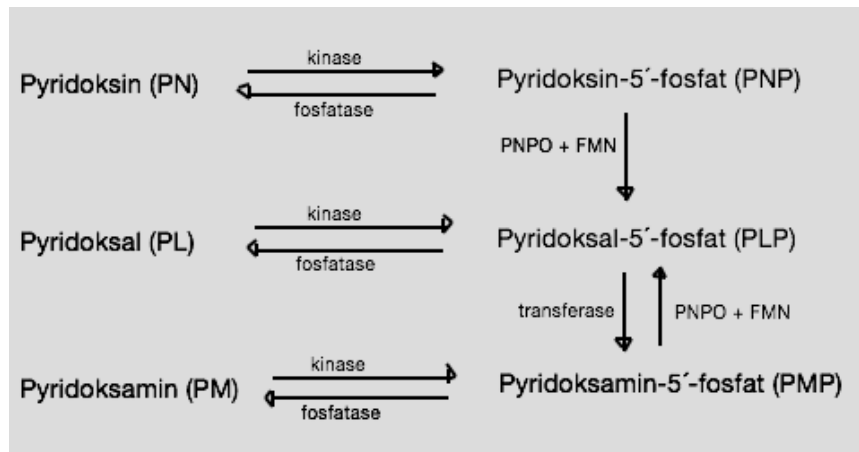
1.1.2 Pyridoksin (Vitamin B₆)

Pyridoksin ble identifisert på 1930-tallet under navnet vitamin B₆ (14). Totalt finnes det 6 forbindelser som samlet betegnes som vitamin B₆; pyridoksin (PN), pyridoksal (PL) og pyridoksamin (PM) samt deres fosforylerte derivater pyridoksin-5'-fosfat (PNP), pyridoksal-5'-fosfat (PLP) og pyridoksamin-5'-fosfat (PMP) (figur 7). PLP og i mindre grad PMP er de metabolsk aktive formene av vitaminet og fungerer som koenzym i et hundretalls enzymatiske reaksjoner involvert i omsetningen av aminosyrer og karbohydrater (15, 16). De andre formene for vitamin B₆ har ulike funksjoner og kan i tillegg omdannes til PLP *in vivo* (17). Navnet pyridoksin kommer av pyridinringen som er felles i struktur for samtlige forbindelser. Derivatene skiller hverandre ved ulike sidekjerder på C'4 (14).



Figur 7: Kjemisk struktur til de ulike vitamin B₆-forbindelsene, inkludert nedbrytningsproduktet 4-PA..

Vitamin B₆ er vannløselig og finnes blant annet i kjøtt, fullkorn og poteter. De ufosforlyerte formene av vitamin B₆ absorberes i tarmen, før de fosforlyeres og videre oksideres til PLP i leveren ved hjelp av enzymet pyridoksin-5'-fosfat oksidase (PNPO). PNPO avhenger av FMN som koenzym (figur 8) (17, 18). PL er den formen for vitamin B₆ som hyppigst transporteres fra leveren til andre vev og celler. Cellene absorberer PL, som deretter omdannes til PLP (17).

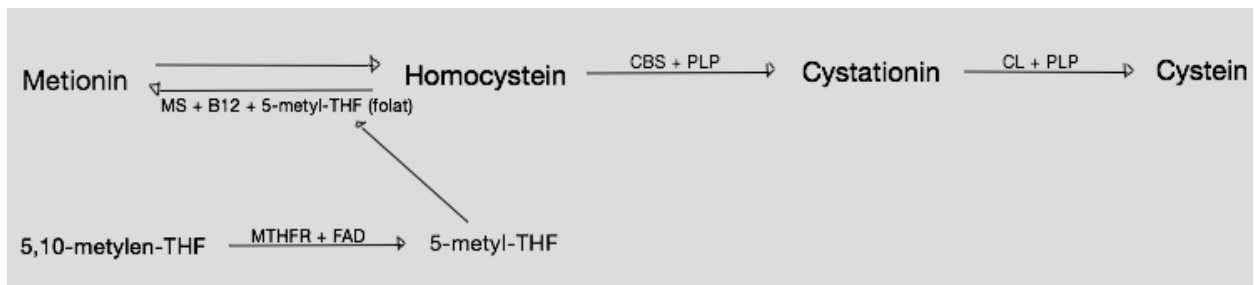


Figur 8: Dannelse av pyridoksal-5'-fosfat (PLP). De ufosforlyerte formene av vitamin B₆ absorberes i tarmen, fosforlyeres og oksideres til PLP. Oksidasjonsreaksjonene katalyseres av enzymet pyridoksin-5'-fosfat oksidase (PNPO), som avhenger av FMN som koenzym.

Alle former for vitamin B₆ er forholdsvis ustabile forbindelser som påvirkes av pH og temperatur, men er mer varmestabile i surt miljø (14). Et nedbrytningsprodukt i metabolismen av vitamin B₆ er 4-pyridoksin-5'-syre (4-PA), som dannes ved defosforlyring og oksidasjon av PLP i leveren (figur 7). 4-PA skiller ut gjennom urinen (1).

B₆-vitaminene er essensielle i ett-karbon metabolismen. Ett-karbon metabolismen inkluderer en rekke biokjemiske reaksjoner som overfører metylgrupper enkeltvis fra et sted til et annet, danner nukleotider til syntese og reparasjon av DNA, samt metylerer DNA. Den primære metyldonoren er folat, mens vitamin B₆ og B₁₂ er viktige koenzym. Dette gir vitamin B₆ mulige beskyttede egenskaper mot kreft, da mangel kan føre til endret DNA/RNA-metylering og forstyrrelser i DNA-reparasjonssystemet (19).

Det er rapportert at omtrent 4% av all intracellulær enzymaktivitet avhenger av PLP, som er av høyest forekomst hos mennesket. Sammen med folat, vitamin B₁₂ og vitamin B₂ er PLP et essensielt koenzym i metabolismen av aminosyren homocystein. PLP regulerer aktiviteten til enzymene cystationin β-syntase (CBS) og cystationin lyase (CL). CBS omdanner aminosyren homocystein til cystationin, som videre brytes ned til cystein katalysert av CL (figur 9) (19-22). Cystein benyttes i proteinsyntesen, og inngår blant annet i tripeptidet glutation (GSH) (23). Vitamin B₁₂ og folat fungerer som koenzym for metionin syntase (MS) som katalyserer remetyleringen av homocystein til metionin (figur 9), og mangel på PLP og/eller vitamin B₁₂ og folat kan dermed føre til akkumulering av homocystein (19, 20).



Figur 9: Oversikt over metabolismen av homocystein. PLP regulerer aktiviteten til enzymene cystationin β-syntase (CBS) og cystationin lyase (CL), som katalyserer omdannelsen av homocystein til cystein. Remetylering av homocystein til metionin katalyseres av metionin syntase (MS), som avhenger av vitamin B₁₂ og folat. Den aktive formen av folat dannes ved hjelp av enzymet 5,10-metylenetetrahydrofolat reduktase (MTHFR), som avhenger av FAD som koenzym.

Homocystein inneholder en tiol-gruppe (–SH) som ved oksidasjon til et disulfid fører til dannelsen av superoksid anioner og hydrogenperoksid, såkalte reaktive oksygenforbindelser (ROS). ROS har negativ innvirkning på epitelet i åreveggene, og kan føre til aktivering av redoks-sensitive transkripsjonsfaktorer. Videre kan dette føre til inflammasjon, oksidativt stress og endotelial dysfunksjon, som fremmer utviklingen av vaskulær sykdom (22).

Forskning på dyr har vist at behandling med B-vitaminer senker nivået av homocystein i plasma og dermed også bremser den vaskulære inflammasjonen. Tross sterke bevis for at homocystein øker risikoen for kardiovaskulær sykdom har flere kliniske forsøk hittil vist liten/ingen effekt på risikoen for sykdomsutvikling og mortalitet ved Hcy-senkende behandling med B-vitaminer. Observasjonsstudier har gitt sterke indikasjoner på at vitamin B₆ har en signifikant effekt, men kliniske forsøk for å bekrefte dette er ennå begrenset og det er behov for videre studier innen feltet (19, 22).

Det har blitt rapportert konsentrasjonsverdier for PLP og 4-PA i plasma hos friske personer ved HPLC på henholdsvis 40.6 (8.4-165.0) nmol/L og 17.5 (3.7-114.8) nmol/L (median og (range)) i følge R. Cabo et al. (20). Mangel på vitamin B₆ kan føre til blant annet anemi, depresjon og hudforandringer. Nyere forskning har i tillegg fokusert på den mulige tilknytningen til kroniske sykdommer som kreft og vaskulære sykdommer, i assosiasjon med akkumulering av homocystein (19).

1.2 Frie radikaler og oksidativt stress

Et atom består normalt av en kjerne av protoner og nøytroner med elektronpar sirkulerende i bane rundt kjernen. Noen atomer og molekyler har ett eller flere uparede elektroner i sitt ytterste skall, og kalles frie radikaler. Frie radikaler er vanligvis ustabile og høyreaktive da de uparede elektronene har en tendens til å spontant danne par med elektroner i andre forbindelser, som fører til at forbindelsene oksideres (24). Frie radikaler dannes blant annet i redoksreaksjoner eller når det oppstår brudd i en kjemisk binding i et molekyl slik at hvert fragment beholder ett elektron hver fra elektronparet (25). Overskudd av frie radikaler i kroppen fører til skade på cellulære proteiner, membranlipider og nukleinsyrer, og kan føre til DNA-mutasjoner og celledød (14, 25).

Reaktive oksygenforbindelser (ROS) er en samlebetegnelse som inkluderer frie radikaler og andre ikke-radikale oksygenderivater fra metabolismen av oksygenmolekyler (O_2) *in vivo*. ROS dannes ved at elektroner i molekylene eksiteres, hvilket gjør dem mer reaktive enn det opprinnelige oksygenmolekylet. Eksempler på ROS er superoksid, hydrogenperoksid og hydroksylradikaler. Kun de forbindelsene som har uparede elektroner klassifiseres som frie radikaler (14, 24).

Frie radikaler og andre reaktive forbindelser dannes *in vivo* fra den normale cellemetabolismen eller via eksterne kilder som forurensning, sigarettøyk og stråling. Dannelse i cellene skjer enten via enzymatiske eller ikke-enzymatiske reaksjoner. Eksempelvis genereres superoksid anion-radikalet ($O_2^{\cdot-}$) fra ulike oksidase-enzymmer, og kan videre delta i ulike reaksjoner som fører til dannelse av blant annet ikke-radikalet hydrogenperoksid (25).

Oksidativt stress defineres som en tilstand med økt dannelse av reaktive oksygenforbindelser (ROS) og frie radikaler, eller redusert evne til å eliminere dem (12, 14). Tilstanden innehar en sentral rolle i utviklingen av ulike kroniske og livsstilsrelaterte sykdommer, deriblant aterosklerose, hypertensjon, diabetes mellitus og kreft (25). Oksidativt stress anses som skadelig fordi frie radikaler angriper biologiske molekyler som lipider, proteiner og DNA. Tilstanden fører blant annet til aktivering av en rekke

proteinkinaser involvert i ulike reaksjonsveier som påvirker cellene med hensyn til proliferasjon, apoptose og inflammasjon. På den annen side har oksidativt stress en nyttig rolle i fysiologisk adaptasjon og i reguleringen av intracellulær signaltransduksjon, og en mer korrekt betegnelse av oksidativt stress er "en tilstand der oksidative krefter overgår antioksidantsystemene grunnet ubalanse mellom dem" (24). En viktig faktor for å senke graden av oksidativt stress er et økt antioksidant-potensiale (12).

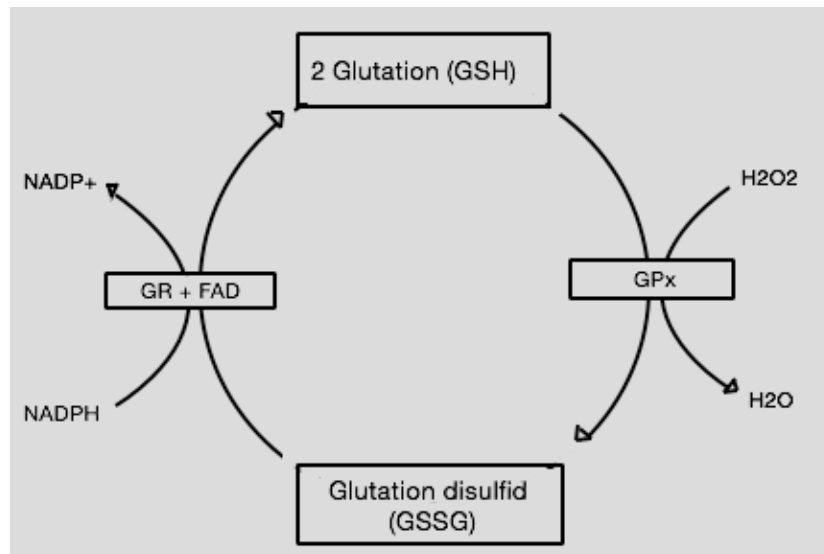
Årsaker til utvikling av livsstilssykdommer kan skyldes tre hovedfaktorer; gener, livsstilsvaner og miljø. Ofte spiller flere ulike årsaksfaktorer inn, og det kan derfor være utfordrende å identifisere dem. Mange daglige vaner er knyttet til oksidativt stress, slik som røyking, alkohol og et ubalansert kosthold (26).

1.2.1 Antioksidantforsvar

Menneskekroppen har mekanismer for å motvirke oksidativt stress, og en rekke antioksidantsystemer er utviklet gjennom evolusjonen (24). Antioksidanter nøytraliserer og reparerer skader forårsaket av frie radikaler og andre reaktive forbindelser ved å selv oksideres. Dette styrker det biokjemiske forsvaret og minimerer risikoen for utvikling av sykdom. Det skilles mellom endogene og eksogene antioksidanter, der endogene antioksidanter syntetiseres i kroppen mens eksogene antioksidanter må tilføres via mat eller kosttilskudd. Endogene antioksidanter deles inn i enzymatiske og ikke-enzymatiske antioksidanter (25). De viktigste endogene antioksidantene er glutathion (GSH) og de GSH-relaterte enzymene glutathion peroksidase (GPx), glutathion reduktase (GR), superoksid dismutase (SOD) og katalase (25, 27).

GSH er et tripeptid bestående av aminosyrene glutaminsyre, cystein og glysin. Syntesen skjer i omtrent alle celletyper og katalyseres av enzymene γ -glutamylcystein syntetase (GCS) og glutathion syntetase (GSS). Studier har vist at cystein er begrensende faktor, da lageret av cystein i kroppen er relativt lite (26). Tiol-gruppen på cystein gir GSH kraftig reduserende egenskaper, og tripeptidet spiller en viktig rolle i nøytraliseringen av en rekke reaktive forbindelser. Viktigste er nøytralisering av peroksid, for eksempel hydrogenperoksid. GPx

katalyserer redoksreaksjonen der GSH fungerer som elektrondonor og oksideres til GSSG, samtidig som hydrogenperoksid reduseres til H₂O. GSSG reduseres tilbake til GSH ved hjelp av det NADPH-avhengige enzymet glutation reduktase (GR) (figur 10). Opprettholdelse av en normal GSH: GSSG-ratio i cellene er avgjørende for overlevelse. Mangel på GSH utsetter cellene for oksidativ skade, og ubalanse i mengden GSH er observert i en rekke sykdomstilstander (26, 27).



Figur 10: Glutation-redoks-syklusen. Glutation (GSH) fungerer som elektrondonor ved nøytralisering av peroksider, katalysert av glutation peroksidase (GPx). GSH oksideres og danner GSSG, og kan tilbakedannes til redusert form ved hjelp av enzymet glutation reduktase (GR).

GR avhenger av FAD som koenzym for å opprettholde sin funksjon. FAD transporterer hydrogen fra NADPH til GSSG, som dermed reduseres til GSH. Mangel på riboflavin kan derfor påvirke antioksidantegenskapene til GSH. Flere dyrestudier har vist et redusert nivå av GSH ved riboflavin-mangel. Det er dog kun utført én studie på mennesker, som ikke viste signifikant forskjell i GSH-nivået hos personer med og uten mangel på riboflavin. En årsak kan være økt syntese av glutation som kompensasjon for manglende riboflavin. En annen mulig forklaring kan være at GR har evnen til å opprettholde nivået av GSH i vevet, selv ved lavt aktivitetsnivå (12).

1.3 Nyresykdom

Nyrenes hovedfunksjon er å opprettholde en stabil, fysiologisk homeostase. Dette skjer ved regulering av væske- og elektrolyttbalansen i kroppen, samt utskillelse av avfallsstoffer gjennom urinen som produseres. Nyrene inneholder omlag 3 millioner nefroner, som sørger for filtrering av blodet. Blodet ledes til nefronene via nyrearterien og forgrener seg til små kapillærnøster kalt glomerulus, omsluttet av en tynn, dobbeltvegget kapsel (Bowmans kapsel). Fra glomerulus diffunderer små molekyler og ioner fra blodet passivt gjennom porer i kapillærendotelet ut i kapselrommet, og danner primærurinen. Primærurinen filteres og entrer tubulusapparatet, et rørsystem bestående av tre deler, der urinen filtreres videre i flere trinn før den til slutt fraktes via urinlederne til urinblæren.

Da nyrene har stor betydning for kroppens funksjon, kan sykdommer knyttet til nyrene få store konsekvenser. En rekke sykdommer er kjent, både akutte og kroniske. Blant kroniske sykdommer er blant annet IgA-nefritt og arvelig polycystisk nyresykdom (28).

1.3.1 Arvelig polycystisk nyresykdom

Polycystisk nyresykdom (PKD) er en samlebetegnelse for en gruppe monogene sykdommer som fører til dannelse av cyster i nyrene. Over 20 ulike gener knyttet til sykdomsutvikling er hittil identifisert, og koder for ulike proteiner lokalisert til ciliene i nyrene. De to vanligste formene for PKD er autosomal dominant og autosomal recessiv polycystisk nyresykdom. Felles for alle sykdommene er involveringen av cilier og basallegemer i patogenesen. Tap av eller abnormaliteter i ciliene er assosiert med utviklingen av cyster. (29)

Autosomal dominant polycystisk nyresykdom (ADPKD) er den vanligste formen for PKD. Sykdommen fremtrer som regel hos voksne og skyldes mutasjon i genene PKD1 eller PKD2, som koder for reseptorliknende proteiner. ADPKD er systemisk, og dannelse av cyster rammer blant annet også lever og pankreas. I mange tilfeller fører sykdommen til nyresvikt og medfører behov for dialyse eller transplantasjon. (29)

1.3.2 IgA-nefritt

IgA-nefritt er den vanligste formen for glomerulonefritt, som er betennelse i glomerulus. Tilstanden er immunologisk og gir opphopning av immunkomplekser i kapillærnettene som fører til forandringer og skade i nyrevevet (30).

Ved IgA-nefritt inneholder immunkompleksene immunglobulin A. Tilstanden er hyppigere hos menn, gir som regel lite symptomer og påvises ofte tilfeldig ved mikroskopisk hematuri. Nyrefunksjonen påvirkes hos 30-40% av pasientene, og omtrent 10% kan få alvorlig nedsatt nyrefunksjon med behov for dialyse eller nyretransplantasjon. Høyt blodtrykk forekommer hos noen av pasientene (31).

1.3.3 Nyresykdom og oksidativt stress

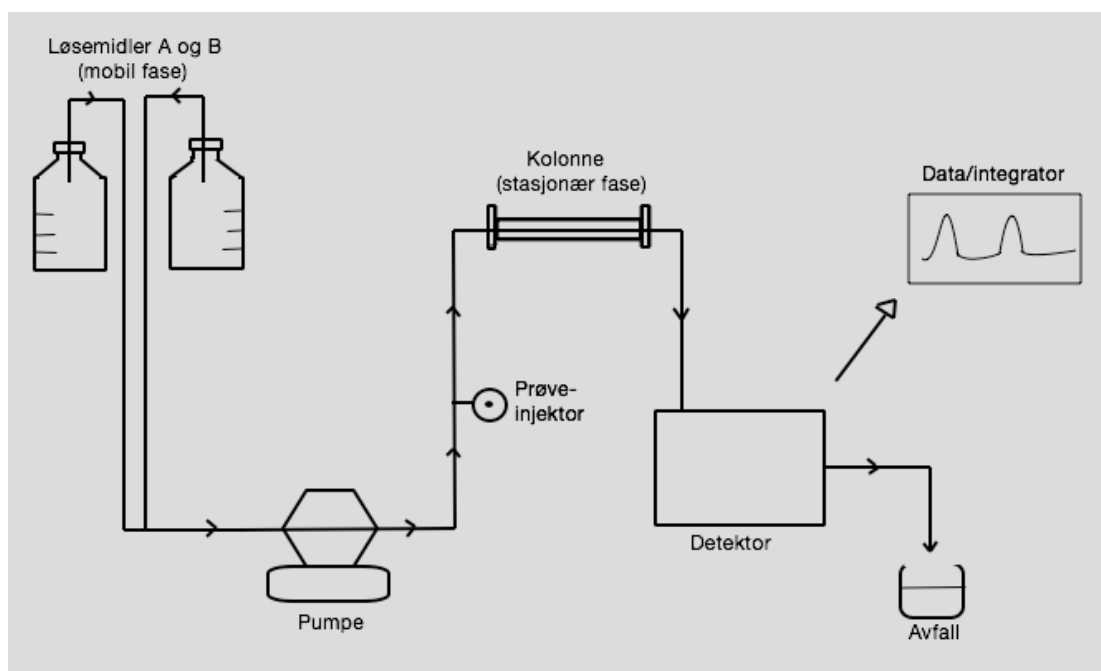
Pasienter med kronisk nyresykdom og/eller nyresvikt har høy forekomst av blant annet kardiovaskulær sykdom og malignitet, og har generelt høy morbiditet og mortalitet sammenliknet med friske individer. Dette har trolig sammenheng med økt grad av oksidativt stress. Årsaker er blant annet svekket antioksidantforsvar, polymorfismer i reparasjonsgener og hyperhomocysteinemi. De fleste pasienter med nedsatt nyrefunksjon har et forhøyet nivå av homocystein i plasma. Dette øker graden av oksidativt stress, da homocystein er utsatt for autooksidasjon som sekundært fører til dannelse av ROS. I tillegg kan homocystein hemme aktiviteten til essensielle antioksidant-enzymmer (30, 32).

Et økt nivå av homocystein i plasma kan indikere mangel på folat og/eller vitamin B₁₂ som følge av svekket remetylering, men metionin-homocystein-metabolismen er et komplisert system og videre undersøkelser innen feltet er nødvendig (11, 23). Flere studier har indikert at et lavt inntak av riboflavin er assosiert med økt konsentrasjon av homocystein i plasma hos friske subjekter, trolig grunnet sin funksjon som koenzym ved aktivering av folat (33-35). Den første studien av sammenhengen mellom riboflavin og homocystein hos pasienter med nyresvikt ble utført i 2002, der en tverrsnittsstudie i Østerrike viste en negativ lineær assosiasjon mellom plasmakonsentrasjonen av homocystein og nivået av riboflavin i erythrocytter hos pasienter med nyresvikt (11).

1.4 Høytrykk væskekromatografi (HPLC)

Væskekromatografi (LC) er en metode som separerer molekyler fra hverandre i en prøve ved bruk av spesifikke løsemidler eller buffere. Det er utviklet ulike typer væskekromatografi for analyse av ulike typer forbindelser, som sammen utgjør omtrent 60 % av separasjonsteknologien benyttet i biovitenskapen verden over. Høytrykk væskekromatografi (high performance liquid chromatography) er en kvantitativ analysemetode med høy grad av presisjon, nøyaktighet og spesifisitet, og har evnen til å separere molekyler med svært små strukturelle forskjeller. Metoden benytter trykk for hurtig separasjon, deteksjon og kvantitering av blant annet aminosyrer, proteiner, lipider og ioner i ulike typer prøvemateriale. HPLC blir brukt til både diagnostiske- og forskningsformål (36-38).

Et HPLC-system inneholder i hovedsak en prøveinjektor, en pumpe, en mobil fase bestående av én eller flere løsemidler/buffere, en stasjonær fase omgitt av en stålkolonne, en detektor og en integrator (figur 11). En avgasser er koblet til instrumentet for å fjerne luftbobler fra den mobile fasen, da dette kan forstyrre separasjonsprosessen. Et typisk HPLC-system har kapasitet på inntil 392 prøver. Systemet kan kjøres automatisk og kontrolleres av et dataprogram (36).



Figur 11: Fremstilling av et standard HPLC-system bestående av løsemidler (mobil fase), pumpe, prøveinjektor, kolonne (stasjonær fase), detektor, data/ integrator og avfallsbeholder.

Avhengig av hvilke forbindelser som skal separeres benyttes to ulike LC-metoder ved HPLC; normal-fase kromatografi (NPLC) og revers-fase kromatografi (RPLC). Ved NPLC består den stasjonære fasen av polare molekyler som eksempelvis hydroksylgrupper (–OH), mens den mobile fasen inneholder upolare organiske løsemidler. Prøvekomponentene elueres etter økende polaritet slik at de minst polare komponentene elueres først (36).

Ved RPLC består den stasjonære fasen av upolare molekyler, mens den mobile fasen er mer polar og inneholder acetonitril, metanol, vann eller en kombinasjon av disse (37). Da de fleste organiske molekyler har noen upolare områder, holdes stoffene i prøven tilbake i kolonnen fordi vann i den mobile fasen frastøter de upolare områdene og fremmer interaksjon mellom prøvekomponentene og den stasjonære fasen. RPLC er en presis og robust metode, og er den mest benyttede formen for kromatografi. I tillegg er den mobile fasen kompatibel med de fleste biologiske prøver (36).

1.4.1 Metodeprinsipp

Kolonnen og rørsystemet i analyseinstrumentet har en lav indre diameter, og proteiner i de biologiske prøvene felles ut før analyse for å unngå obstruksjoner. Til dette benyttes ofte triklorsyre (TCA) eller andre forbindelser med denaturerende egenskaper (36).

Den mobile fasen i HPLC-instrumentet består av én eller flere buffere/løsemidler og tillages med ønsket sammensetning og pH for optimal separasjon, avhengig av analyttens polaritet. Pumpen sender den mobile fasen kontinuerlig gjennom systemet med et bestemt trykk. Prøven injiseres via prøveinjektoren og fraktes med den mobile fasen gjennom en kolonne (stasjonær fase), som også er tilpasset analyttens egenskaper (37). Kolonnen er en metallsylinder med en indre diameter på 0.2-0.46 cm, lengde fra 5-25 cm og er fylt med partikler. Ved HPLC benyttes som regel silica-partikler, da de tåler høyt trykk. Partiklene er bundet til grupper med ulike egenskaper avhengig komponentene som analyseres. I kolonnen separeres prøvekomponentene, en prosess som oppstår som følge av interaksjoner mellom funksjonelle grupper på molekylene i prøven, mobil fase og stasjonær

fase basert på polaritet. Små forskjeller i fysiske egenskaper blant de ulike molekylene i prøven utnyttes, og større interaksjon mellom stasjonær fase og molekylene fører til at molekylene beveger seg langsommere gjennom kolonnen (38). I tillegg konkurrerer den mobile fasen med stoffene i prøven om bindingssetene i kolonnen, og jo sterkere interaksjon mellom mobil fase og analyttene, jo kortere blir retensjonstiden (36). Retensjonstiden kan defineres som tiden det tar fra prøven injiseres i instrumentet til analytten passerer detektoren. Dersom to buffere av ulik sammensetning benyttes, kan forholdet mellom dem endres underveis for å øke eller minske retensjonstiden. Dette kalles gradienteluering. Dersom bufferforholdet er det samme hele analysetiden, kalles det isokratisk eluering (38). Eluatet passerer videre en detektor som produserer elektroniske signaler proporsjonale med konsentrasjonen til den enkelte prøvekomponent. Signalene overføres til en datamaskin og angis som topper i et kromatogram ved hjelp av en programvare knyttet til instrumentet (37).

1.4.2 Opprettelse av standardkurve

En standardrekke med tilhørende standardkurve benyttes for å beregne konsentrasjonen av analyttene i en prøve. Standardrekken tillages ved fortykning av en stamløsning med kjent konsentrasjon, og standardene analyseres sammen med prøvene. Deretter plottes konsentrasjonen til de ulike standardene mot målt fluorescens/absorbans, og en standardkurve opprettes ved hjelp av enkel regresjonsanalyse. Dette gir en ligning som benyttes til å estimere konsentrasjonen av analyttene i de ukjente prøvene (36). De ukjente forbindelsene identifiseres ved å sammenlikne retensjonstiden mot de kjente standardene, sett at de er analysert under identiske betingelser (37).

1.4.3 HPLC-detektorer

Valg av detektor avhenger av kjemisk struktur og mengde av forbindelsene som skal kvantifiseres. UV/VIS-detektorer er mest benyttet, mens fluorescensdetektorer har signifikant høyere sensitivitet og spesifisitet enn UV-detektorene og benyttes blant annet for måling av forbindelser med naturlig fluorescerende egenskaper, slik som vitamin B₂ og B₆. Ved fluorescensdeteksjon eksiterer prøvekomponentene lys ved én bølgelengde og emitterer lys ved en annen bølgelengde. Det emitterte lyset kalles fluorescens og har lavere energi og lenger bølgelengde enn det eksiterte lyset.

2. Formål med oppgaven

Pasienter med kronisk nyresykdom har ofte økt grad av oksidativt stress og et forhøyet nivå av homocystein i plasma, og generelt høy morbiditet og mortalitet sammenliknet med den friske befolkningen. Vitamin B₂ og B₆ er involvert i metabolismen av metionin til cystein, der homocystein er intermediat. I tillegg fungerer vitamin B₂ som koenzym i det primære endogene antioksidantforsvaret der glutation (GSH) står sentralt, og både vitamin B₂ og B₆ trekkes frem som potensielt viktige bidragsyttere i kroppens antioksidantforsvar. I min oppgave ønsket jeg å undersøke nivået av vitamin B₂ og B₆ samt noen av deres viktigste koenzymformer hos en gruppe pasienter med kronisk nyresykdom, og sammenlikne nivåene mot en antatt frisk kontrollgruppe. Det foreligger mye informasjon om betydningen av nivåene av vitamin B₁₂, folat og homocystein i plasma hos pasienter med kronisk nyresykdom, men tilgjengelig forskning på vitamin B₂- og B₆-status hos pasienter med kronisk nyresykdom er begrenset. En årsak til dette kan være at vitamin B₂ og B₆ per dags dato ikke måles ved rutinelaboratorier. Formålet med oppgaven har vært å bidra til økt kunnskap innen dette feltet. I tillegg ble det metoden for analyse av vitamin B₂ optimalisert i forbindelse med utskiftning av et HPLC-instrument. Følgende problemstillinger er etablert:

- Optimalisere en HPLC-fluorescensmetode for kvantifisering av riboflavin, FAD og FMN i plasma og fullblod
- Måle konsentrasjonen av riboflavin, FAD og FMN i plasma og fullblod hos pasienter med nyresykdom og friske personer
- Måle konsentrasjonen av PLP og nedbrytningsproduktet 4-PA i plasma hos pasienter med nyresykdom og friske personer ved hjelp av en tidligere etablert HPLC-metode
- Benytte statistiske metoder til sammenlikning av konsentrasjonsnivåene av B₂- og B₆-vitaminene i pasientgruppen og kontrollgruppen, og sammenlikne nivået av B₂-vitaminene i fullblod og plasma

3. Materialer og metoder

3.1 Deltakere til prosjektet og prøveinnsamling

Min oppgave er en del av en større studie i regi av Helse Stavanger (39). Rekruttering av deltakere samt innsamling av prøvemateriell ble utført av sertifisert personell ved Stavanger Universitetssykehus, og benyttes i flere delstudier. Samtlige deltakere har avgitt informert samtykke, og studiene ble på forhånd godkjent av REK vest, referansenummer 2014/318 (vedlegg 1).

Totalt 198 personer deltok i studien (tabell 1), både menn og kvinner i alderen 19 til 78 år. 112 personer med to ulike former for kronisk nyresykdom utgjorde pasientgruppen. Samtlige var pasienter ved poliklinikk for nyresykdommer ved Stavanger universitetssykehus, og var diagnostisert med henholdsvis arvelig polycystisk nyresykdom og IgA-nefritt. 86 personer utgjorde kontrollgruppen, og var antatt friske personer bestående av ansatte ved sykehuset, blodgivere, bekjente samt friske personer i kontakt med nyrepoliklinikken. Fra hver deltaker ble det i 2015 samlet inn blant annet spørreskjemaer, blodprøver og urinprøver. EDTA-fullblod (3 mL rør) og heparin-plasma (250 µL rør) ble benyttet i dette prosjektet, og ble oppbevart ved -80 °C frem til analysetidspunktet. Totalt 24 personer tok tilskudd av B-vitamin ved prøvetakingstidspunktet.

Tabell 1: Oversikt over prosjektdeltakere

	Pasient (n = 112)	Kontroll (n = 86)	Total (n = 198)
Kvinne	44	38	82
Mann	68	48	116
B-vitamin tilskudd	14	10	24

3.2 HPLC-systemet

Konsentrasjonen av vitamin B₂ og B₆ ble bestemt ved hjelp av revers-fase high performance væskechromatografi (HPLC). Laboratoriet jeg arbeidet ved hadde to identiske HPLC-instrumenter av typen Dionex UltiMate 3000, levert av Thermo Scientific (USA). Systemet bestod av en WPS-3000 autosampler, LPG-3400SD pumpe og FLD-3400RS fluorescens-detektor. Kolonnen som ble benyttet for analyse av riboflavin, FAD og FMN var ODS Hypersil, 100 x 4.6 mm med partikkelstørrelse 10 µm, levert av Thermo Scientific. For analyse av PLP og 4-PA ble kolonnen Pinnacle II C18 fra Restek benyttet, 150 x 4.6 mm, partikkelstørrelse 3 µm. Kolonnene holdt romtemperatur under analyseprosessen. Fluorescens-intensiteten i prøvene ble målt ved λ 530 nm (eksitasjon ved λ 450 nm) for vitamin B₂ og λ 300 nm (eksitasjon ved λ 400 nm) for vitamin B₆. Programvaren som sørget for generering av standardkurver og beregning av konsentrasjoner var Chromeleon versjon 7.2.4.8525 (Thermo Scientific).

Kolonnene ble montert og undersøkt for eventuelle lekkasjer før analyse. En kolbe med H₂O tilknyttet HPLC-instrumentet ble skiftet ukentlig. Ved daglig oppstart ble det utført et renseprogram for å skylle gjennom systemet og fjerne eventuelle luftbobler, etterfulgt av priming med egnede buffere for henholdsvis vitamin B₂ og B₆.

3.3 Vitamin B₂

3.3.1 Reagenser og standardløsninger

Trikloreddiksyre (T9159-100G) og natriumacetat (S2889-250G) var fra Sigma, 0.9% NaCl fra Braun. FAD (F6625-250MG), FMN og RF (R7649-100G) ble levert av Sigma (Darmstadt, Tyskland). Standardløsningene benyttet i prosjektet ble tillaget i forbindelse med analyser av vitamin B₂ i 2013, og ble oppbevart ved -80°C sammen med de biologiske prøvene. De benyttede standardene var i konsentrasjonsområdene 3.9 nmol/L til 250 nmol/L for FAD og 0.78 nmol/L til 50 nmol/L for FMN og riboflavin, i tillegg til blankprøve.

Tre ulike buffere ble tillaget og benyttet til analysene. Buffer A inneholdt 0.25 M KH₂PO₄ (Sigma, 60230), pH justert til 2.9 med H₃PO₄ (Sigma). Buffer B ble tillaget fra buffer A og inneholdt KH₂PO₄ med 20% acetonitril (ROMIL, Cambridge, England), pH justert til 2.9 med H₃PO₄. Buffer C ble benyttet til å vaske kolonnen, og bestod av 50% acetonitril (ACN) i ddH₂O. pH ble justert ved hjelp av et 2-trinns kalibrert pH-meter.

3.3.2 Oppstart av HPLC-instrumentet og optimalisering av metode

Metodeoptimaliseringen tok utgangspunkt i en tidligere etablert metode for analyse av vitamin B₂ i fullblod av Speek et al. (40).

Innledningsvis ble standardløsninger, blankprøve og biologiske prøver analysert for å bli kjent med analyseinstrumentet og fremgangsmåten for preparering av prøvene. Målet med optimalisering av metoden var å etablere de mest gunstige analyseforhold i form av jevne, adskilte topper i kromatogrammet med så kort analysetid som mulig. Utprøvinger ble gjort med ulike reagenser for proteinpresipitering, injeksjonsvolum, bufferstrøm (flow), bufferforhold og mengde syre/base til proteinpresipitering. Etter utprøving og justeringer var gjort ble det utført ulike kvalitetstester for å kontrollere presisjon og riktighet, før analyseringen av prøvene til prosjektet kunne gjennomføres.

Bufferforhold 45% A og 55% B (totalt 11 % ACN) ved flow 1.500 mL/min med isokratisk eluering ble benyttet, og analys tiden ble satt til 7 minutter. Fluorescens-intensiteten ble stilt til 8 (maksimum) for hele analys tiden i plasma. I fullblod ble intensiteten stilt til 8 for FMN og riboflavin, og 5 for FAD.

3.3.3 Proteinpresipitering

Alt biologisk prøvemateriale ble forbehandlet med trikloreddiksyre (TCA, 20 %) og natrium acetat (2 M) for å fjerne proteiner før analyse. Prepareringen foregikk på is, og prøvene ble beskyttet mot lys. Hansker ble benyttet ved all håndtering av reagenser og prøvemateriell. Multipipette ble benyttet i alle trinn, og reagenser ble oppbevart på is.

3.3.3.1 Plasma

100 µL TCA (20 %) ble overført til merkede eppendorfrør med 200 µL plasma. Prøvene ble blandet på vortexmikser i 30 sekunder og inkubert i 5 minutter ved romtemperatur. Deretter ble prøvene sentrifugert i 10 minutter ved 4 °C og 13000 rpm. 100 µL natrium acetat (2 M) ble så overført til rørene, og prøvene ble blandet 5 ganger før de ble sentrifugert på nytt i 10 minutter ved 4 °C og 13000 rpm. Avslutningsvis ble supernatanten overført fra eppendorfrør til egnete rør for HPLC-analyse. Rørene ble korket, eventuelle luftbobler fjernet og rørene plassert i rack i analyseinstrumentet.

Standarder og blankprøve ble behandlet på samme måte som plasmaprøver under prøveprepareringen.

200 µL plasma	eller	100 µL fullblod
		+ 100 µL ddH ₂ O

+ 100 µL TCA (20%)
+ 100 µL natrium acetat (2M)

3.3.3.2 Fullblod

100 µl fullblod + 100 µl ddH₂O ble overført til merkede eppendorfrør og blandet på vortexmikser i 15 sekunder. Deretter ble prøvene fryst ved -80 °C i 15 minutter, tint ved 4 °C og fryst på nytt ved -80 °C etterfulgt av tining ved 4 °C. H₂O tilsatt i prøvene krystalliserer ved nedfrysing og fører til at erytrocyttene i blodet lyserer. Prøvene ble så tilsatt 100 µl TCA (20 %), blandet på vortexmikser i 30 sekunder og inkubert 5 minutter i romtemperatur, etterfulgt av sentrifugering i 10 minutter ved 4 °C og 13000 rpm. 100 µl natrium acetat ble deretter overført til rørene, og prøvene ble blandet 5 ganger før de ble sentrifugert på nytt i 10 minutter ved 4 °C og 13000 rpm. Supernatanten ble overført fra eppendorfrør til egnete rør for HPLC-analyse. Rørene ble korket, eventuelle luftbobler fjernet og rørene plassert i rack i analyseinstrumentet.

I motsetning til standardene fortynnes fullblod 1:2 under prepareringen, og prøveresultatene i fullblod ble derfor multiplisert med 2 for å få korrekte verdier.

3.3.4 Standardkurve og linearitet

Ved undersøkelse av grad av linearitet ble standarder i duplikat med konsentrasjon 15.6 nmol/L til 1000 nmol/L for FAD og 3.9 nmol/L til 250 nmol/L for FMN og riboflavin analysert, i tillegg til blankprøve. Standardløsninger med kjent konsentrasjon ble benyttet til å lage fortynningsrekkene. Gjennomsnittsverdiene av duplikatene ble plottet mot arealet av toppene i kromatogrammet, og individuelle standardkurver for de tre forbindelsene ble generert ved hjelp av Excel. Grad av linearitet ble vurdert visuelt og ved hjelp av R²-verdiene tilhørende standardkurvene.

3.3.5 Nedre målegrense

For å bestemme nedre målegrense ble det benyttet standardløsninger med kjent konsentrasjon til å lage fortynningsrekker bestående av 8 prøver med gradvis stigende konsentrasjon, fra 0.49 nmol/L til 7.81 nmol/L for FAD og 0.12 nmol/L til 1.95 nmol/L for FMN og riboflavin. Blankprøve ble også analysert. Laveste målbare verdier ble deretter bestemt til konsentrasjonen der toppene fortsatt skilte seg tydelig fra bakgrunnsstøy i kromatogrammene.

3.3.6 Variasjonskoeffisient (CV)

For å vurdere metodens presisjon ble variasjonskoeffisient (CV %) beregnet for totalt 40 heparin-plasma prøver og 40 prøver i heparin-fullblod. Prøvene var fra samme individ, ble tatt ved samme tidspunkt og behandlet etter nøyaktig samme prosedyre. Hver dag i 4 dager ble 10 plasma- og 10 fullblod-prøver samt standarder og blankprøve analysert. Fullblod- og plasmaprøvene ble analysert og behandlet separat. Ved hjelp av Excel ble gjennomsnitt, standardavvik og variasjonskoeffisient for hver enkelt dag beregnet for henholdsvis riboflavin, FMN og FAD. Til slutt ble total variasjonskoeffisient over 4 dager for de tre forbindelsene beregnet.

CV % ble beregnet etter følgende formel:

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100\%$$

hvor s = standardavvik og \bar{X} = gjennomsnittsverdi i prøveutvalget.

Konsentrasjonsverdiene i fullblod ble multiplisert med 2 før beregning av CV %.

3.3.7 Recovery assay

For å vurdere metodens riktighet ble det utført en recovery-test i henholdsvis heparin-fullblod og heparin-plasma. 10 µL FAD, FMN og riboflavin med kjent konsentrasjon i to ulike nivåer ble tilsatt separat til 150 µL plasma/75 µL ddH₂O + 75 µL blod. Før tilsetning av B₂-vitaminene ble 40 µL 0.25 M EDTA tilsatt samtlige prøver, som ble blandet med vortexmikser og inkubert i 10 minutter før tilsetning av standarder. Resultatene ble sammenliknet med resultater fra prøver tilsatt 0.9 % NaCl i stedet for vitaminene, og konsentrasjonen av tilsatte standarder ble beregnet i prøver der plasma/fullblod ble byttet ut med 0.9 % NaCl.

Recovery (%) ble beregnet ved hjelp av følgende formel:

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{[\textit{spiked}] - [\textit{baseline}]}{[\textit{added}]} \times 100 \%$$

hvor

[spiked] = total konsentrasjon i biologisk prøve tilsatt FAD/FMN/Riboflavin,

[baseline] = utgangskonsentrasjon i prøven (tilsatt 0.9 % NaCl) og

[added] = konsentrasjon av tilsatt FAD/FMN/riboflavin

Resultatene for fullblod ble unntaksvis ikke multiplisert med 2 før utregning av recovery (%). Årsaken er at forholdene blir feil da tilsatt standardløsning i prøvene ikke er fortynnet 1:2, i motsetning til blodet. Utregningene blir likevel korrekte da man er opptatt av forholdet mellom konsentrasjonen i «baseline» og i «spiked» prøve, og ikke mengden i seg selv.

3.3.8 Prøver fra prosjektdeltakere

Vitamin B₂ ble analysert i EDTA-fullblod og heparin-plasma. Prøvene var merket med numre som ble brukt som identitetsmerking gjennom hele analyseprosessen.

Før analyse ble det tillaget 400 mL TCA (20 %) og 400 mL natrium acetat (2 M), tilstrekkelig til preparering av samtlige prøver. En liten mengde TCA/natrium acetat ble daglig overført fra flaskene til en plastbeholder for bruk, for å unngå kontaminering. Det ble også laget opp tilstrekkelig mengde buffer for analyse av alle prøver i henholdsvis plasma og fullblod. En standard og blankprøve fra foregående dag ble analysert ved daglig oppstart for å kontrollere instrumentet.

Prøvene med EDTA-fullblod ble tint 40-50 minutter i romtemperatur og deretter i kjøleskap, slik at temperaturen på prøvene skulle holde seg ved maksimalt 4 °C. Etter fullstendig tining ble hver prøve blandet 20 ganger før 100 µL fullblod ble overført med pipette til merkede eppendorfrør sammen med 100 µL dobbeltdestillert H₂O.

Plasmaprøvene ble plassert 5 minutter på benk og deretter i kjøleskap. Prøvene ble sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 rpm, 4 °C for å samle eventuelt lipid-koagel i bunnen av rørene. Deretter ble 200 µL plasma overført til merkede eppendorfrør. Blod- og plasmaprøver ble videre behandlet i henhold til metodene for prøvepreparering (kapittel 3.3.3).

Prøvene ble analysert sammen med en standardrekke inkludert blankprøve, preparert på samme måte som plasmaprøvene. Nye standarder ble tatt opp til bruk hver dag. I tillegg ble det daglig analysert kontroller; prøver tatt fra samme individ ved samme tidspunkt og med kjent konsentrasjon. En kontroll ble plassert etter hver 10. – 15. pasientprøve. Standarden med høyest konsentrasjon ble i tillegg analysert etter siste deltakerprøve. Kontroll og standard ble dermed benyttet til å monitorere analyseinstrumentets riktighet.

Blod- og plasmaprøver ble analysert separat, med ulike innstillinger for fluorescenssensitivitet i HPLC-instrumentet.

3.4 Vitamin B6

3.4.1 Reagenser og standardløsninger

Trikloreddiksyre (T9159-100G) var fra Sigma (Darmstadt, Tyskland), 0.9 % NaCl fra Braun (Melsungen, Tyskland). PLP (82870-5G) og 4-PA (P9630-25MG) var fra Sigma. Nye standardløsninger ble tillaget ved oppstart, i konsentrasjonsområdet 3.12 nmol/L til 200 nmol/L for PLP og 1.56 nmol/L til 100 nmol/L for 4-PA. 4-PA ble først løst i 1 % NaOH og videre i ddH₂O grunnet dårlig løselighet i vann.

To bufferløsninger ble tillaget og benyttet til analysene. Buffer A inneholdt 0.1 M KH₂PO₄ (Sigma, 60230), 0.1 M NaClO₄ (Sigma, 410241-100G og 381225-100G) og 0.5 g/L NaHSO₃ (Acros Organics, A0316856), pH justert til 3.0 med H₃PO₄ (Sigma). Buffer B inneholdt 0.1 M KH₂PO₄, 0.1 M NaClO₄ og 0.5 g/L NaHSO₃ med 20% ACN (ROMIL, Cambridge, England), pH justert til 3.0 med H₃PO₄. En tredje løsning ble benyttet til å vaske kolonnen, og bestod av 70 % ACN i ddH₂O. pH ble justert ved hjelp av et 2-trinns kalibrert pH-meter.

3.4.2 Oppstart av HPLC-instrumentet

Ved analyse av PLP og 4-PA ble det benyttet en allerede etablert metode utført av R. Cabo et al. (20). Nye reagenser og buffere ble tillaget før analyse, og renseprogram og priming med buffer ble gjennomført på analyseinstrumentet.

Innledningsvis ble plasma- og blodprøver samt blankprøve analysert for å kontrollere analyseforholdene, da analysen sist ble tatt i bruk i 2013. Opprinnelig analysetid var totalt 20 minutter inkludert vaskefase, og ble oppjustert til 24 minutter for å forlenge vaskefasen grunnet uønskede toppen i blankprøven. Dette minsket størrelsen på toppene. I tillegg ble fluorescens-intensiteten nedjustert ved de uønskede toppene, da de ikke interfererte med toppene for PLP og 4-PA. Injeksjonsvolumet ble justert fra 25 µL til 20 µL, da begge volumene ble testet og gav gode resultater.

3.4.3 Proteinpresipitering

Prøvene ble behandlet med TCA (16 %) for å fjerne proteiner før analyse. Prepareringen foregikk på is, og prøvene ble beskyttet mot lys. Hansker ble benyttet ved all håndtering av reagenser og biologisk prøvemateriell. Multipipette ble benyttet i alle trinn, og reagenser ble oppbevart på is.

3.4.3.1 Plasma

50 µL TCA (16 %) ble overført til merkede eppendorfrør med 50 µL plasma. Prøvene ble blandet på vortexmikser i 1 minutt og deretter sentrifugert i 10 minutter ved 4 °C og 13000 rpm. Supernatanten ble så overført til egnete rør for HPLC-analyse. Rørene ble korket, eventuelle luftbobler fjernet og rørene ble plassert i et rack i analyseinstrumentet.

50 µL plasma	eller	25 µL fullblod
		+ 25 µL ddH ₂ O

3.4.3.2 Fullblod

+ 50 µL TCA (16%)

25 µL fullblod og 25 µL ddH₂O ble overført til merkede eppendorfrør og blandet på vortexmikser i 15 sekunder. Deretter ble prøvene fryst ved -80 °C i 15 minutter, tint ved 4 °C og fryst på nytt ved -80 °C etterfulgt av tining ved 4 °C. 50 µL TCA (16 %) ble tilsatt prøvene, prøvene ble blandet på vortexmikser i 1 minutt og deretter sentrifugert i 10 minutter ved 4 °C og 13000 rpm. Supernatanten ble overført til egnede rør for HPLC-analyse.

3.4.4 Standardkurve og linearitet

Standardløsninger med kjent konsentrasjon ble benyttet til å lage en fortynningsrekke i konsentrasjonsområdet 7.8 nmol/L til 1000 nmol/L for PLP og 3.9 nmol/L til 500 nmol/L for 4-PA, i tillegg til blankprøver. Prøvene ble analysert i duplikat, og gjennomsnittet av duplikatene ble plottet mot arealet av toppene for opprettelse av standardkurver i Excel. Grad av linearitet ble deretter vurdert både visuelt og ved hjelp av R^2 -verdiene tilhørende standardkurvene.

3.4.5 Variasjonskoeffisient (CV)

Totalt 30 heparin-plasmaprøver ble analysert fordelt over 3 dager for beregning av variasjonskoeffisient (CV). Prøvene var fra samme individ, ble tatt ved samme tidspunkt og behandlet etter nøyaktig samme prosedyre. Beregning av CV (%) ble utført etter samme prosedyre som for vitamin B₂ (kapittel 3.3.6).

3.4.6 Prøver fra prosjektdeltakere

Prøvene var merket med numre som ble brukt som identitetsmerking gjennom hele analyseprosessen. Før analyse ble det tillaget 400 mL TCA (16 %), tilstrekkelig til preparering av samtlige prøver. For å unngå kontaminering ble en liten mengde TCA ble daglig overført fra flasken til en plastbeholder for bruk. Det ble også laget opp tilstrekkelig mengde buffer for analyse av alle prøvene. En standard og blankprøve fra foregående dag ble analysert ved oppstart for å kontrollere instrumentet.

Plasmaprøvene ble plassert 5 minutter på benk og deretter i kjøleskap for tining. Prøvene ble sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 rpm, 4 °C for å samle eventuelt lipid-koagel i bunnen av rørene. Deretter ble 50 µL plasma overført til merkede eppendorfrør, og videre behandlet i henhold til metoden for generell prøvepreparering (kapittel 3.4.3).

Prøvene ble analysert sammen med en standardrekke inkludert blankprøve, preparert på samme måte som plasmaprøvene. Nye standarder ble tatt opp til bruk hver dag. I tillegg ble det daglig analysert kontroller; prøver fra samme individ og med kjent konsentrasjon, én kontroll etter hver 10. – 15. pasientprøve. Standarden med høyest konsentrasjon ble i tillegg analysert etter siste deltakerprøve.

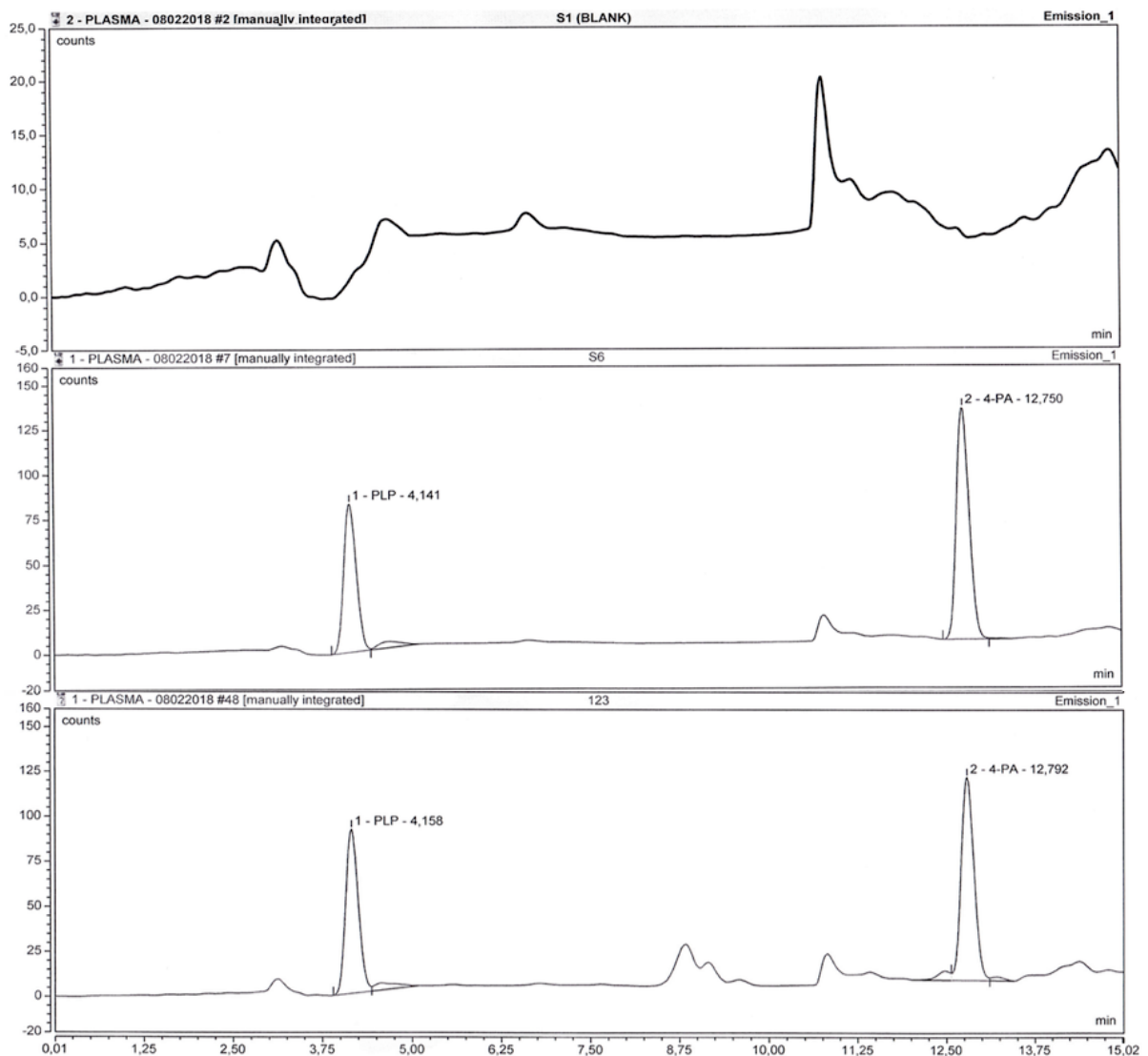
3.5 Statistiske metoder

Dataene fra kontrollgruppen og pasientgruppen presenteres med median, kvartiler samt laveste og høyeste verdi. Mann-Whitney U test ble benyttet for sammenlikning av konsentrasjonsnivåene i kontrollgruppen og pasientgruppen. Testen er ikke-parametrisk, og tilsvarer uavhengig t-test ved parametrisk metode. Signifikansnivået ble satt til 0.05. For undersøkelse av korrelasjon mellom de ulike forbindelsene ble Spearman's rang-korrelasjon benyttet. Analysene ble utført med statistikkprogrammet IBM® SPSS® Statistics (versjon 23).

4. Resultater

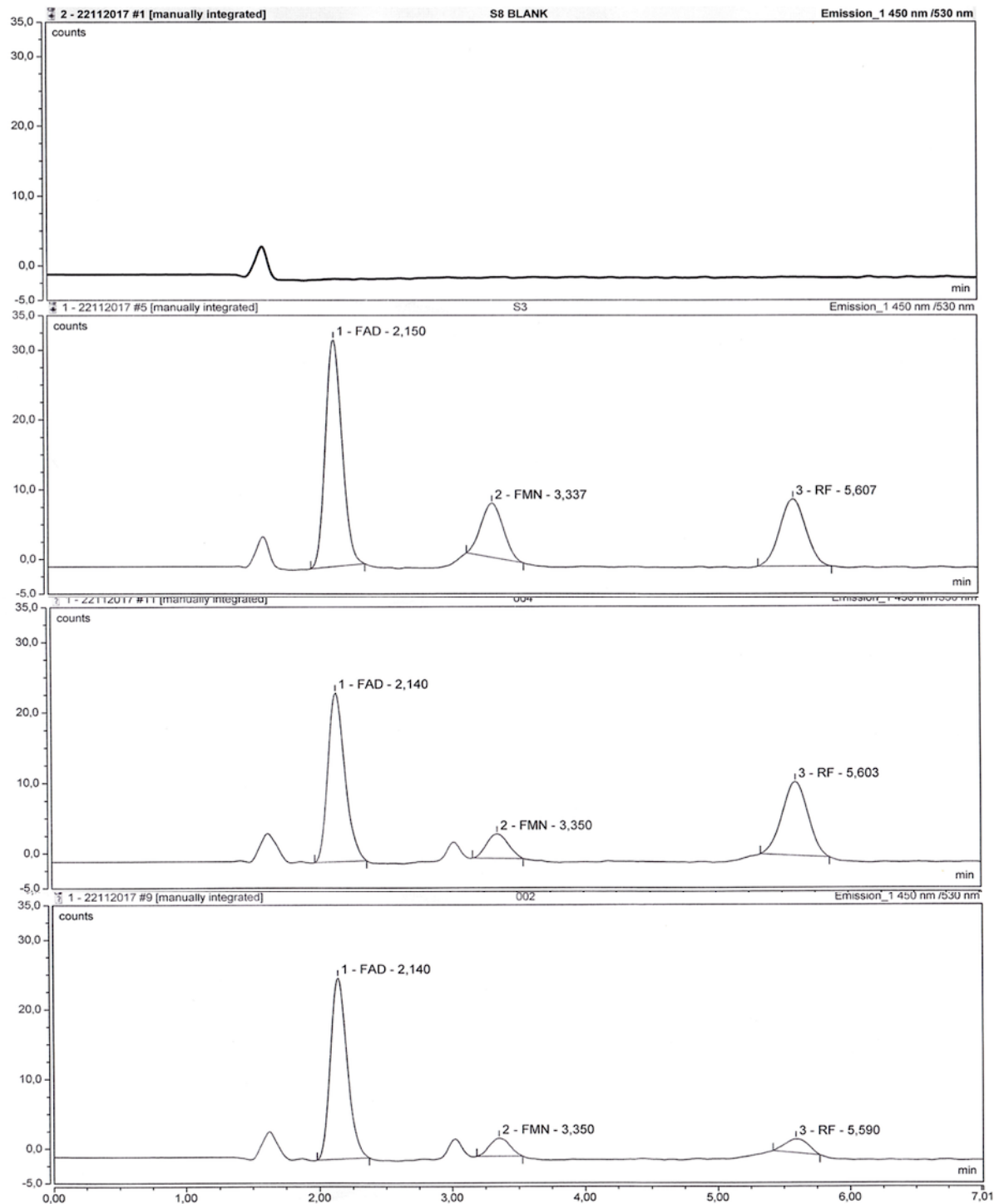
Samtlige utregninger ble gjort med maksimalt antall desimaler, og avrunding ble først gjort ved presentasjon av resultatene i tabeller i teksten. Ved utregning av CV (%) og recovery (%) med bruk av tallene presentert i tabellene kan resultatene derfor avvike noe fra oppgitte resultater.

4.1 Kromatogrammer



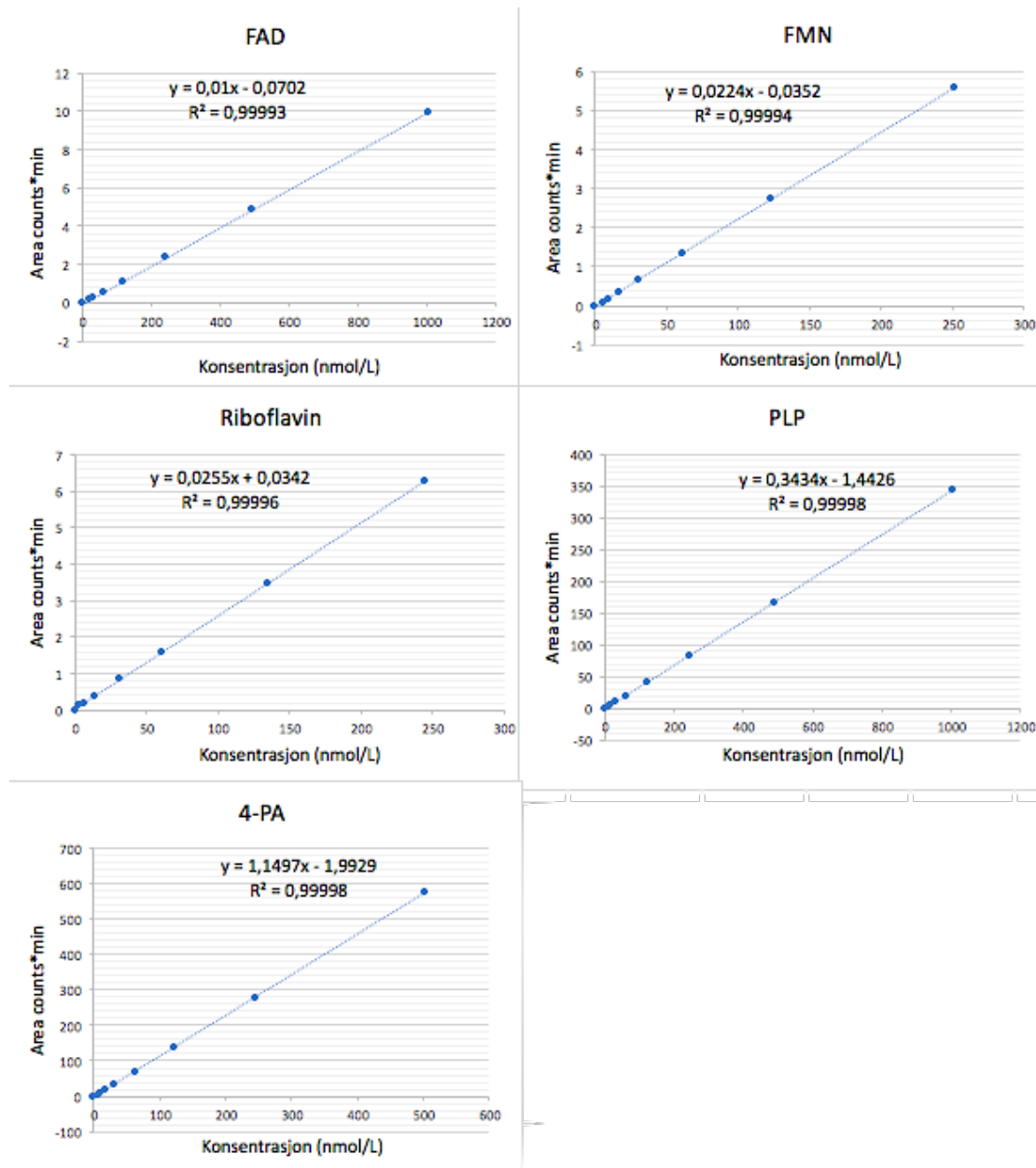
Figur 12: Kromatogrammer av blankprøve, standard og plasma (øverst til nederst) for PLP og 4-PA. Retensjonstid (min) er angitt langs x-aksen, fluorescens-signal (area counts*min) langs y-aksen.

Figur 12 og 13 viser kromatogrammer for analyse av henholdsvis vitamin B₆ og vitamin B₂. x-aksen angir retensjonstid, mens y-aksen angir fluorescens-signal i prøvene.



Figur 13: Kromatogrammer fra blankprøve, standard, plasma og fullblod (øverst til nederst) for FAD, FMN og riboflavin (RF). Retensjonstid (min) er angitt langs x-aksen, fluorescens-signal (area counts*min) langs y-aksen.

4.2 Standardkurve og linearitet



Figur 14: Lineært regresjonsplott mellom standarder og korresponderende fluorescens-signal for henholdsvis FAD, FMN, riboflavin, PLP og 4-PA.

Figur 14 viser lineære regresjonsplott for FAD, FMN, RF, PLP og 4-PA. Det ble benyttet standardkonsentrasjoner fra 0 til 1000 nmol/L for FAD, 0 til 250 nmol/L for FMN og riboflavin, 0 til 1000 nmol/L for PLP og 0 til 500 nmol/L for 4-PA. Konsentrasjonene er plottet på x-aksen, og fluorescens-signaler på y-aksen. Grafene er oppgitt med likninger og R^2 -verdier.

4.3 Nedre målegrense

Fortynningsrekker av 9 ulike konsentrasjonsnivåer med standardløsninger for FAD, FMN og riboflavin ble benyttet for å bestemme nedre målegrense. FAD ble analysert i konsentrasjonsområde fra 0 nmol/L til 7.8 nmol/L, FMN og riboflavin i området fra 0 nmol/L til 2.0 nmol/L. Nedre målegrense ble bestemt til 1.0 nmol/L for FAD og 0.5 nmol/L for FMN og riboflavin.

4.4 Variasjonskoeffisient (CV)

Dag-til-dag variasjonen for FAD, FMN og riboflavin over 4 dager ble bestemt separat i heparin-plasma og heparin-fullblod (tabell 2). Dag-til-dag CV for FAD var fra 1.1 % til 4.2 %, FMN fra 1.3 % til 3.9 % og riboflavin fra 1.2 % til 9.6 %. Total CV for FAD var 2.6 % og 2.7 %, FMN var 7.1 % og 5.1 % og riboflavin gav 2.6 % og 13.6 % i henholdsvis plasma og fullblod. Impresisjonen til PLP og 4-PA ble målt separat i heparin-plasma over 3 dager (tabell 3). En prøve fra dag 1 ble utelatt grunnet analysefeil, og totalt antall prøver ble 29. Dag-til-dag CV for PLP var fra 0.7 % til 1.4 %, og 4-PA fra 0.4 til 0.5 %. Total CV var 3.2 % for PLP og 0.5 % for 4-PA.

Tabell 2: CV (%) og gjennomsnittskonsentrasjon \pm standardavvik (SD) for FAD, FMN og riboflavin i plasma og fullblod

	FAD		FMN		Riboflavin	
	Gjennomsnitt \pm SD (nmol/L)	CV (%)	Gjennomsnitt \pm SD (nmol/L)	CV (%)	Gjennomsnitt \pm SD (nmol/L)	CV (%)
<i>Heparin-plasma</i>						
Dag 1 (n = 10)	55.4 \pm 0.9	1.6	3.7 \pm 0.1	2.7	11.2 \pm 0.3	2.8
Dag 2 (n = 10)	52.8 \pm 0.9	1.6	4.0 \pm 0.1	1.3	11.5 \pm 0.2	2.1
Dag 3 (n = 10)	53.5 \pm 0.7	1.3	4.2 \pm 0.1	2.3	11.6 \pm 0.1	1.2
Dag 4 (n = 10)	52.4 \pm 0.6	1.1	3.6 \pm 0.1	1.9	11.2 \pm 0.3	2.3
Total (n = 40)	53.5 \pm 1.4	2.6	3.9 \pm 0.3	7.1	11.4 \pm 0.3	2.6
<i>Heparin-fullblod</i>						
Dag 1 (n = 10)	190.0 \pm 2.8	1.4	9.6 \pm 0.2	2.5	2.9 \pm 0.2	6.5
Dag 2 (n = 10)	191.9 \pm 8.0	4.2	9.1 \pm 0.4	3.9	2.2 \pm 0.1	3.5
Dag 3 (n = 10)	193.2 \pm 5.0	2.6	10.0 \pm 0.2	2.2	2.3 \pm 0.2	9.6
Dag 4 (n = 10)	191.6 \pm 3.6	1.9	9.1 \pm 0.4	3.9	2.5 \pm 0.2	9.3
Total (n = 40)	191.7 \pm 5.2	2.7	9.4 \pm 0.5	5.1	2.5 \pm 0.3	13.6

Tabell 3: CV (%) og gjennomsnittskonsentrasjon \pm standardavvik (SD) for PLP og 4-PA i plasma

	PLP		4-PA	
	Gjennomsnitt \pm SD (nmol/L)	CV (%)	Gjennomsnitt \pm SD (nmol/L)	CV (%)
<i>Heparin-plasma</i>				
Dag 1 (n = 9)	111.6 \pm 1.5	1.4	69.1 \pm 0.4	0.5
Dag 2 (n = 10)	119.6 \pm 0.9	0.7	69.3 \pm 0.3	0.4
Dag 3 (n = 10)	118.6 \pm 1.2	1.0	69.0 \pm 0.3	0.5
Total (n = 29)	116.8 \pm 3.7	3.2	69.1 \pm 0.3	0.5

4.5 Recovery assay

To ulike konsentrasjonsnivåer av FAD, FMN og riboflavin ble tilsatt henholdsvis heparin-plasma og heparin-fullblod. Recovery for FAD var fra 75% til 88%, FMN fra 58% til 84% og riboflavin fra 71% til 86% (tabell 4).

Tabell 4: Recovery-analyse for FAD, FMN og riboflavin i plasma og fullblod

	Konsentrasjon før tilsetning (baseline)	Tilsatt konsentrasjon (added)	Konsentrasjon etter tilsetning (spiked)	Mengde recovered (spiked – baseline)	Recovery (%)
<i>Heparin-plasma</i>					
FAD 1	45.5	87.4	121.0	75.5	86
FAD 2	45.5	183.2	206.7	161.2	88
FMN 1	10.2	72.1	70.6	60.5	84
FMN 2	10.2	147.7	133.8	123.7	84
Riboflavin 1	13.0	46.1	50.4	37.4	81
Riboflavin 2	13.0	91.0	91.7	78.7	86
<i>Heparin-fullblod</i>					
FAD 1	87.5	89.9	154.5	67.1	75
FAD 2	87.5	180.2	225.6	138.2	77
FMN 1	9.5	44.5	35.6	26.1	59
FMN 2	9.5	91.2	62.2	52.7	58
Riboflavin 1	0.5	40.7	29.5	29.0	71
Riboflavin 2	0.5	85.0	62.1	61.5	72

Konsentrasjonsheter er angitt i nmol/L.

Alle prøver ble analysert i triplikate, og konsentrasjonsverdiene i tabellen representerer gjennomsnittsverdier av triplikatene.

4.6 Prøver fra prosjektdeltakere

Tabell 5-7 viser resultatene for konsentrasjonsnivåene av vitamin B₂ og B₆ samt p-verdier fra Mann-Whitney U test i henholdsvis kontrollgruppen og pasientgruppen. I kontrollgruppen var medianverdiene i plasma 48.1 nmol/L for FAD, 7.5 nmol/L for FMN, 5.2 nmol/L for riboflavin, 41.8 nmol/L for PLP og 19.4 nmol/L for 4-PA. Medianverdiene i fullblod var 176.7 nmol/L for FAD, 19.4 nmol/L for FMN og 1.7 nmol/L for riboflavin. I pasientgruppen var medianverdiene i plasma 48.0 nmol/L for FAD, 6.4 nmol/L for FMN, 6.2 nmol/L for riboflavin, 41.6 nmol/L for PLP og 31.5 nmol/L for 4-PA. Medianverdiene i fullblod var 176.1 nmol/L for FAD, 20.5 nmol/L for FMN og 2.1 nmol/L for riboflavin.

FAD og FMN viste ingen signifikant forskjell mellom de to gruppene, hverken i plasma eller fullblod. PLP viste heller ingen signifikant forskjell mellom gruppene. En signifikant forskjell i nivået av riboflavin mellom pasientgruppen og kontrollgruppen er observert, både i plasma ($p = 0.036$) og i fullblod ($p = 0.025$). I tillegg sees en signifikant forskjell i nivået av 4-PA i plasma ($p < 0.001$).

Tabell 5: Konsentrasjoner av FAD, FMN og riboflavin i heparin-plasma fra kontrollgruppe og pasientgruppe

	FAD		FMN		Riboflavin	
	Kontroll (n = 86)	Syk (n = 112)	Kontroll	Syk	Kontroll	Syk
Median	48.1	48.0	7.5	6.4	5.2	6.2
Laveste verdi	36.2	36.4	1.2	1.2	0.8	1.1
Høyeste verdi	68.3	62.7	25.8	28.4	41.9	83.7
25-persentil	44.3	43.9	4.6	4.7	3.5	3.8
75-persentil	51.7	53.0	9.6	10.3	7.6	11.4
p-verdi* (Mann-Whitney U test)	0.498		0.912		0.036	

Alle resultater er angitt i konsentrasjonsenhet nmol/L.

* Signifikansnivå = 0.05

Tabell 6: Konsentrasjoner av FAD, FMN og riboflavin i EDTA-fullblod fra kontrollgruppe og pasientgruppe

	FAD		FMN		Riboflavin	
	Kontroll (n = 86)	Syk (n = 112)	Kontroll	Syk	Kontroll	Syk
Median	176.7	176.1	19.4	20.5	1.7	2.1
Laveste verdi	137.1	136.6	6.8	7.4	0.6	0.6
Høyeste verdi	218.0	243.9	47.6	85.3	9.7	23.4
25-persentil	164.0	164.5	14.6	16.3	1.3	1.5
75-persentil	188.6	192.6	24.2	29.0	2.7	3.8
p-verdi* (Mann-Whitney U test)	0.304		0.058		0.025	

Alle resultater er angitt i konsentrasjonsenhet nmol/L.

* Signifikansnivå = 0.05

Tabell 7: Konsentrasjoner av PLP og 4-PA i heparin-plasma fra kontrollgruppe og pasientgruppe

	PLP		4-PA	
	Kontroll (n = 86)	Syk (n = 112)	Kontroll	Syk
Median	41.8	41.6	19.4	31.5
Laveste verdi	8.9	13.3	7.3	10.4
Høyeste verdi	142.0	277.7	48.0	161.6
25-persentil	28.3	31.0	15.3	20.6
75-persentil	51.6	54.4	23.8	43.0
p-verdi* (Mann-Whitney U test)	0.580		<0.001	

Alle resultater er angitt i konsentrasjonsenhet nmol/L.

* Signifikansnivå 0.05

Tabell 8 og 9 viser resultatene av Spearman's rang-korrelasjon for konsentrasjonene av vitamin B₂ i fullblod og plasma i kontrollgruppen og pasientgruppen. I kontrollgruppen var FAD i plasma negativt assosiert med riboflavin (RF) i fullblod ($r_s = -0.27$, $p < 0.05$). FMN i plasma var direkte assosiert med riboflavin i plasma ($r_s = 0.58$, $p < 0.01$), FMN i fullblod ($r_s = 0.63$, $p < 0.01$) og riboflavin i fullblod ($r_s = 0.56$, $p < 0.01$). Riboflavin i plasma var direkte assosiert med FMN i fullblod ($r_s = 0.59$, $p < 0.01$) og riboflavin i fullblod ($r_s = 0.69$, $p < 0.01$). FAD i fullblod var direkte assosiert med FMN i fullblod ($r_s = 0.37$, $p < 0.01$), og FMN i fullblod var direkte assosiert med riboflavin i fullblod ($r_s = 0.41$, $p < 0.01$).

Tabell 8: Spearman korrelasjon for konsentrasjoner av vitamin B₂ i plasma og fullblod hos kontrollgruppen

	FMN plasma	RF plasma	FAD fullblod	FMN fullblod	RF fullblod
FAD plasma	0.04	-0.09	0.06	0.09	-0.27*
FMN plasma		0.58**	0.04	0.63**	0.56**
RF plasma			0.14	0.59**	0.69**
FAD fullblod				0.37**	0.09
FMN fullblod					0.41**

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

I pasientgruppen var FAD i plasma negativt assosiert med FMN i plasma ($r_s = -0.22$, $p < 0.05$). FMN i plasma var direkte assosiert med riboflavin i plasma ($r_s = 0.46$, $p < 0.01$), FMN i fullblod ($r_s = 0.34$, $p < 0.01$) og riboflavin i fullblod ($r_s = 0.51$, $p < 0.01$). Riboflavin i plasma var direkte assosiert med FAD i fullblod ($r_s = 0.32$, $p < 0.01$), FMN i fullblod ($r_s = 0.65$, $p < 0.01$) og riboflavin i fullblod ($r_s = 0.80$, $p < 0.01$). FAD i fullblod var direkte assosiert med FMN i fullblod ($r_s = 0.43$, $p < 0.01$) og svakt assosiert med riboflavin i fullblod ($r_s = 0.24$, $p < 0.05$). FMN i fullblod var direkte assosiert med riboflavin i fullblod ($r_s = 0.39$, $p < 0.01$).

Tabell 9: Spearman korrelasjon for konsentrasjoner av vitamin B₂ i plasma og fullblod hos pasientgruppen

	FMN plasma	RF plasma	FAD fullblod	FMN fullblod	RF fullblod
FAD plasma	-0.22*	-0.08	0.13	-0.09	-0.15
FMN plasma		0.46**	0.07	0.34**	0.51**
RF plasma			0.32**	0.65**	0.80**
FAD fullblod				0.43**	0.24*
FMN fullblod					0.39**

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

Tabell 10 og 11 viser resultatene av Spearman korrelasjon for plasmakonsentrasjonene av vitamin B₂ og B₆ i henholdsvis kontrollgruppen og pasientgruppen. I kontrollgruppen var FMN direkte assosiert med riboflavin ($r_s = 0.58$, $p < 0.01$) og PLP ($r_s = 0.53$, $p < 0.01$), mens PLP var direkte assosiert med 4-PA ($r_s = 0.44$, $p < 0.01$). I pasientgruppen var FAD svakt negativt assosiert med FMN ($r_s = -0.22$, $p < 0.05$). FMN var direkte assosiert med riboflavin ($r_s = 0.46$, $p < 0.01$), PLP ($r_s = 0.42$, $p < 0.01$) og 4-PA ($r_s = 0.23$, $p < 0.05$). Riboflavin var direkte assosiert med 4-PA ($r_s = 0.42$, $p < 0.01$), og PLP var assosiert med 4-PA ($r_s = 0.27$, $p < 0.01$).

Tabell 10: Spearman korrelasjon for konsentrasjoner av vitamin B₂ og B₆ i plasma hos kontrollgruppen

	FMN	Riboflavin	PLP	4-PA
FAD	0.04	-0.09	0.12	0.15
FMN		0.58**	0.53**	0.15
Riboflavin			0.17	0.10
PLP				0.44**

** $p < 0.01$

Tabell 11: Spearman korrelasjon for konsentrasjoner av vitamin B₂ og B₆ i plasma hos pasientgruppen

	FMN	Riboflavin	PLP	4-PA
FAD	-0.22*	-0.08	-0.10	0.09
FMN		0.46**	0.42**	0.23*
Riboflavin			0.13	0.42**
PLP				0.27**

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

5. Diskusjon

5.1 Vitamin B₂

5.1.1 Optimalisering av metode

5.1.1.1 Proteinpresipitering i plasma

Under utprøvingen ble det sammenliknet resultater for plasmaprøver preparert med TCA (20 %) og henholdsvis natrium acetat (2 M) eller ammonium acetat (2 M). Ulike volum syre/base ble også testet, og 200 µL plasma ble tilsatt 50 µL TCA og 50 µL acetat sammenliknet mot 200 µL plasma tilsatt 100 µL TCA og 100 µL acetat. Natrium acetat gav topper med større areal enn ammonium acetat og ble derfor foretrukket. 100 µL syre/base gav topper med større areal enn 50 µL, til tross for at plasma tilsatt 100 µL er mer fortynnet. Dette kan tyde på at økt mengde syre gav økt frigjøring av B₂-vitaminene fra plasmaproteiner. Vi besluttet at 100 µL TCA (20%) og 100 µL natrium acetat (2 M) var best egnet til proteinpresipiteringen.

5.1.1.2 HPLC-analyse

FAD er den mest polare av de tre B₂-vitaminene og ble eluert først, etterfulgt av FMN og til slutt riboflavin. Retensjonstid og separasjon av prøvekomponentene avhenger av konsentrasjonen av organisk fase i bufferløsningen(e), og økt mengde gjør den mobile fasen mindre polar slik at affiniteten til prøveforbindelsene blir større og analyttene elueres raskere (36). Speek et al. (40) benyttet kun én bufferløsning med metanol som organisk løsemiddel, mens det i denne metoden ble benyttet acetonitril (ACN) og to bufferløsninger med ulik konsentrasjon av ACN. Kombinasjonen av to bufferløsninger forenklet arbeidet ved optimalisering av metoden, da forholdet mellom bufferne og dermed også mengden ACN i den mobile fasen enkelt kunne justeres. Under oppstarten ble buffer A tillaget med 10 % ACN og buffer B med 20 % ACN, med forhold 60 % buffer A og 40 % buffer B som totalt gav omtrent 14 % ACN. Deretter ble buffer B laget med 20 % ACN og buffer A uten ACN. Årsaken

er at mengden ACN var enklere å kontrollere når den var tilstede i kun én av løsningene, i tillegg til at buffer A kunne tillages i større mengde da ACN fordampes noe over tid. pH i bufferløsningene ble justert til 2.9 tilsvarende metoden til Speek et al. (40), hvor det ble utført forsøk som viste at fluorescens-intensiteten i prøvene var pH-avhengig. pH ble derfor bestemt til det området som gav maksimal intensitet.

Ulike injeksjonsvolum (25 µL, 50 µL og 100 µL) ble testet. Halvert injeksjonsvolum forventes å gi tilsvarende halvering av arealet av toppene. Vi besluttet å benytte 100 µL injeksjonsvolum da dette gav de tydeligste toppene, og konsentrasjonsområdet for noen av analyttene var relativt lavt.

Analysetiden var også avhengig av bufferstrømmen (flow) gjennom instrumentet. Under oppstartfasen var analysetiden stilt til 15 minutter. Innledende test-analyser med 14 % ACN i mobil fase og flow 1.500 mL/min gav retensjonstid på under 4 minutter for samtlige prøveforbindelser. Under disse forhold observerte vi en ukjent topp som interfererte med toppen for FAD. Toppen var tilstede i både blankprøve, standardprøver og biologiske prøver og skyldtes derfor trolig bufferløsningene. Justeringer ble derfor gjort for å øke retensjonstiden og bedre skille toppene fra hverandre.

Det ble testet ulike flow; 1.250, 1.500, 1.750 og 2.000 mL/min. Ved flow 1.500 mL/min og med bufferforhold 45 % A (uten ACN) og 55 % B (20 % ACN) som gav totalt 11 % ACN i mobil fase, ble toppene tydelig adskilt. Disse forholdene ble besluttet å være de mest optimale for videre analyser. Analysetiden ble nedjustert til 7 minutter, da samtlige forbindelser var eluert etter omtrent 6 minutter. Tidligere metode hadde analysetid på 22 minutter, og dette var dermed en stor forbedring tidsmessig.

Fluorescens-intensiteten ble stilt til 8 (maksimal intensitet) for alle forbindelser i plasma samt for FMN og riboflavin i fullblod, og 5 for FAD i fullblod. Årsaken er at toppen for FAD i fullblod forholdsvis var mye høyere enn toppene for FMN og riboflavin, og dette gjorde det utfordrende å markere toppene med god nøyaktighet. Ved å senke fluorescens-intensiteten for FAD ble høydeforskjellen mellom toppene mindre. Dette påvirker ikke

konsentrasjonsnivåene, da innstillingen også gjaldt for standardrekken og forholdet mellom standarder og prøver dermed ble korrekte.

Toppene i kromatogrammene ble markert manuelt, og det var derfor viktig å innarbeide en god teknikk slik at alle ble markert på samme måte. Toppene for riboflavin var mest utfordrende å markere, da konsentrasjonen av riboflavin jevnt over var lav og toppene noe ujevne. Markeringen er avgjørende for konsentrasjonen av de ulike prøvekomponentene, og mye tid gikk med til å sjekke at alle markeringer var gjort på samme måte.

5.1.2 Standardkurve og linearitet

Standardkurvene viste god linearitet opp til konsentrasjonsnivåene 1000 nmol/L for FAD og 250 nmol/L for FMN og riboflavin. Dette fremkommer visuelt da linjen skjærer alle punktene i regresjonsplottene, i tillegg til at R^2 -verdiene (korrelasjonskoeffisient) er >0.99 (figur 14). $R^2 = 1$ indikerer 100 % linearitet. Metoden kan med andre ord benyttes til kvantifisering av B₂-vitaminene innen et bredt konsentrasjonsområde med god nøyaktighet, og standardkurven er lineær langt over forventede konsentrasjonsverdier for forbindelsene.

5.1.3 Nedre målegrense

Ved bestemmelse av nedre målegrense for B₂-vitaminene ble kromatogrammene vurdert visuelt, og grensene ble satt der toppene tydelig skilte seg fra bakgrunnsstøy. Nivået av bakgrunnsstøy var svært lavt. Metoden har evne til å detektere FAD, FMN og riboflavin selv ved svært lave konsentrasjonsnivåer, og viser dermed høy sensitivitet. Metoden jeg tok utgangspunkt i (40) hadde etablert deteksjonsgrenser tilsvarende konsentrasjonene 20 nmol/L for FAD, 15 nmol/L for FMN og 10 nmol/L for riboflavin i fullblod.

I og med at mange konsentrasjonsverdier av riboflavin nærmet seg nedre målegrense, har jeg i retrospekt innsett at det kunne vært utført et grundigere arbeid med bestemmelse av henholdsvis nedre kvantifiseringsgrense og nedre deteksjonsgrense. Det var ikke forventet at verdiene ville bli så lave, da laveste nivå av riboflavin i tidligere publikasjoner var rundt 3 nmol/L. Gjentatte målinger av blankprøve kunne vært utført for å gjøre en mer nøyaktig bestemmelse av nedre grenseverdier med tanke på signal-to-noise ratio. Utfordringen omfatter hovedsakelig analyse i fullblod, da kun én person hadde nivå av riboflavin på <1 nmol/L i plasma. Ved konsentrasjonsnivåer på <1 nmol/L var toppene i kromatogrammet noe ujevne og mer utfordrende å markere.

5.1.4 Variasjonskoeffisient (CV)

Metoden har jevnt over meget god presisjon. CV-verdiene i plasma er jevnt over lavere enn resultatene fra tidligere publikasjoner (tabell 12). Få studier er gjort på nivået av B₂-vitaminene i fullblod. CV i fullblod er jevnt over høyere enn i plasma, og dette kan skyldes at fullblod har høyere viskositet enn plasma og at det dermed blir større variasjon i pipettert mengde. CV-verdiene for riboflavin i fullblod er særlig høye, med total CV 13.6 %. Standardavvikene for riboflavin er lave (0.1 nmol/L–0.3 nmol/L), og indikerer at høye CV-verdier har sammenheng med at gjennomsnittskonsentrasjonen av riboflavin i fullblod er lav. Til sammenlikning er standardavvikene for FAD i fullblod opp til 8.0 nmol/L, men da gjennomsnittskonsentrasjonen er høyere blir CV-verdiene lavere.

5.1.5 Recovery assay

Beregning av recovery (%) bød på utfordringer. Ved første oppsett ble 180 μL plasma/90 μL fullblod + 90 μL ddH₂O tilsatt 20 μL standard uten tilsetning av EDTA. Forsøkene gav recovery på 35 % - 55 %, og optimalt skal recovery være på 90 % - 110 %. Prøvene tilsatt eksogent FAD viste en senkning i nivået av FAD og korresponderende økning i nivået av FMN sammenliknet med prøven uten tilsatt standard. Vi mistenkte derfor at det hadde skjedd en nedbrytning av tilsatt FAD som ble omdannet til FMN.

Nye standardløsninger for FAD ble tillaget og tilsatt 1 % TCA og 0.5 % natrium acetat, som gav lavere pH enn standardløsninger løst i ddH₂O/NaCl. Det er kjent at B₂-vitaminene er mer stabile ved lav pH, slik at dette eventuelt kunne hindre nedbrytning av FAD. Resultatene av nye recovery-forsøk ble likevel de samme som tidligere. Et nytt forsøk ble utført der lik mengde FAD ble tilsatt til henholdsvis plasma og ddH₂O, og forsøket viste ingen økning av FMN i prøven med ddH₂O. Problemet så altså ut til å skyldes eksogent FAD tilsatt plasma. Akimoto et al. (41) har rapportert at enzymer i plasma hydrolyserer eksogent FAD, og at tilsetning av EDTA i overskudd til plasma hemmer disse enzymene. Endogent FAD og FMN er derimot bundet til plasmaproteiner, og blir ikke hydrolysert. Denne informasjonen ble funnet i etterkant av forsøkene, og forklaringen samsvarer bra med egne observasjoner. Videre forsøk inkluderte tilsetning av 40 μL 0.25 M EDTA til 150 μL plasma før tilsetning av 10 μL standardløsning. Tilsetning av EDTA gav betydelige forbedringer i resultatene.

Et forsøk ble gjort for å undersøke om inkubasjonstiden etter tilsetning av EDTA til plasma påvirket resultatene. 40 μL 0.25 M EDTA ble tilsatt 150 μL plasma og inkubert i henholdsvis 0, 5, 15 og 30 minutter før tilsetning av 10 μL FAD. Forsøket viste forskjell i konsentrasjonsnivået av FAD ved øyeblikkelig tilsetning av FAD sammenliknet med inkubasjonstid på 5 minutter, men ingen i inkubasjonstid på 5 minutter eller mer. Det ble besluttet at inkubasjonstid på 10 minutter var tilstrekkelig og samtidig gav god margin med tanke på de observerte resultatene.

I metoden til Speek et al. ble det ikke tilsatt EDTA i recovery-forsøket for FAD i fullblod, og recovery var på 93.1 % og 97.6 % (40). Capo-chichi et al. analyserte FAD, FMN og riboflavin i plasma og fikk recovery på nærmere 100 %, også uten tilsetning av EDTA (42). I sine forsøk har de benyttet 10 % TCA til proteinpresipitering, og skriver at 20 % TCA hydrolyserte FAD til FMN. I denne metoden ble 20 % TCA benyttet, og det er mulig at konsentrasjonen av syre er for høy og kan bidra til hydrolyse av FAD. I en annen artikkel publisert av Midttun et al. benyttes TCA med sluttkonsentrasjon på 2.5 % (25 g/L) til proteinpresipitering, da det ved høyere konsentrasjoner ble observert et tap av FAD med korresponderende økning av FMN (43). Dette forsterker teorien om at tilsetning av EDTA kunne vært unngått ved benyttelse av TCA med lavere konsentrasjon, og forsøk på dette kunne vært interessant å utføre. Hustad et al. (44) beskriver også forskjell i stabilitet mellom endogene og eksogene B₂-vitaminer, og benyttet EDTA som antikoagulant ved prøveinnsamlingen. I følge Akimoto et al. (41) er dog ikke mengden EDTA i prøvetakingsrørene tilstrekkelig for å hindre hydrolyse av FAD og FMN.

En annen mulig årsak til lav recovery (%) kan være at standardløsningene var av svært høy konsentrasjon og ble tilsatt i svært små volum (10 µL). Ved pipettering kan mikroskopiske mengder bli igjen i pipettespissen, som i dette tilfellet muligens har innvirkning på konsentrasjonsnivået i prøven. Det ville vært bedre å benytte standardløsninger med lavere konsentrasjon og tilsette en større mengde, men dette var ikke praktisk gjennomførbart grunnet tilsetning av EDTA samt at prøvene ikke måtte fortynnes i for stor grad.

Til tross for stor forbedring i resultatene for recovery (%) ved tilsetning av EDTA var alle verdiene under 90 %, og lavere i fullblod enn i plasma. En mulig årsak kan være at tilsatt eksogent FAD/FMN/riboflavin bindes til proteiner eller andre forbindelser tilstede i plasma/fullblod, og dermed havner i pelleten ved sentrifugering under proteinpresipiteringen. Det er også usikkert om kvaliteten på B₂-vitaminene varierer mellom ulike leverandører. Recovery-forsøkene var tidkrevende, og vi besluttet etterhvert å gå videre med analyse av prosjektprøver selv om resultatene ikke var optimale. Vi anså likevel metoden som pålitelig for analyse av pasientprøver, da utfordringene var knyttet til tilsetningen av eksogent FAD/FMN/riboflavin og resterende kvalitetsanalyser gav gode resultater.

Tabell 12 viser en oversikt over ulike kvalitetsparametere i tidligere publiserte metoder for kvantifisering av B₂-vitaminene i plasma, i tillegg til egne resultater (uthevet). Metoden utviklet i denne studien krever et lavt prøvevolum, har kort analysetid (retensjonstid) samt god repeterbarhet og reproduserbarhet sammenliknet med en rekke andre metoder. Proteinpresipiteringen er enkel og forgår i to trinn, og metoden er i tillegg billig og krever lite avansert utstyr sammenliknet med eksempelvis LC-MS/MS.

Tabell 12: Beskrivelse av metoder rapportert i litteraturen for måling av FAD, FMN og riboflavin

Prøve- volum	Prøve- material	Deteksjons- system	Analyse- tid	Dag-til-dag CV (%)	Total CV (%)	Recovery (%)	Laveste målte kons. (nmol/L)			Linearitet* (nmol/L)	Ref.
							FAD	FMN	RF		
250 µL	Plasma	HPLC-FLD	-	4.4–7.1	-	93–96	12	7	5	1000	(45)
60 µL	Plasma	LC-MS/MS	8 min	3.1–18	5.9–22	78–163	4	0.4	0.2	400	(43)
1 mL	Plasma	HPLC-FLD	13 min	-	4.3–6.8	91–107	4	3.4	2.9	265	(42)
200 µL	Plasma	HPLC-FLD	7 min	6.6–7.5	8.7	91–105	-	-	-	2000	(46)
500 µL	Plasma	CE-LIF	12 min	4.0–9.0	6.0–12.0	90-103	-	-	-	1000	(44)
200 µL	Plasma	HPLC-FLD	7 min	1.1–2.8	2.6–7.1	81–88	1	0.5	0.5	1000/250	

* Øvre linearitetsgrense

5.1.6 Prøver fra prosjektdeltakere

Tabell 13 viser en oversikt over konsentrasjonsnivåer av FAD, FMN og riboflavin hos friske personer i tidligere publikasjoner, i tillegg til egne resultater (uthevet). Nivået av FAD og riboflavin i plasma er jevnt over noe lavere i denne studien sammenliknet med tidligere studier. Årsaken er uklar, men kan skyldes tilfeldigheter knyttet til utvalget da det er relativt store variasjoner i medianverdiene i tidligere publikasjoner.

Enkelte plasmaprøver gav konsentrasjoner av riboflavin >40 nmol/L, og høyeste verdi var 83.7 nmol/L. Dette overstiger høyeste verdi for riboflavin i standardrekken benyttet under analyse, men aksepteres da metoden viser linearitet for riboflavin opp til 250 nmol/L. Vi undersøkte sammenhengen mellom riboflavin og tilskudd av B-vitamin, da riboflavin-nivået er kjent for å påvirkes i større grad enn FAD og FMN ved tilskudd av B-vitamin (13). Mann-Whitney U viste ingen signifikant forskjell i plasmanivået av riboflavin hos personer som tok tilskudd sammenliknet med personer som ikke tok tilskudd, hverken i kontrollgruppen ($p = 0.562$) eller pasientgruppen ($p = 0.785$). Det var i tillegg svært få deltakere som tok tilskudd av B-vitamin.

Nivået av riboflavin var signifikant høyere både i plasma ($p = 0.036$) og fullblod ($p = 0.025$) ved sammenlikning av pasienter og kontroller. Riboflavin er som kjent ikke biokjemisk aktiv, og må omdannes til koenzymformene FAD og FMN for å utøve sin funksjon i kroppen. En mulig årsak til økt nivå av riboflavin hos pasienter med nyresykdom kan være nedsatt metabolisme av riboflavin til FAD og FMN. Dersom dette er tilfelle kan det i fremtidige studier være interessant å undersøke hvilke konsekvenser akkumulering av riboflavin har for pasienter med nyresykdom, og hva som eventuelt kan være årsaken til nedsatt metabolisme og/eller økt nivå av riboflavin. Dersom akkumulering av riboflavin fører til redusert tilgang til FAD og FMN, kan dette tenkes å ha sammenheng med forhøyet nivå av homocystein og økt grad av oksidativt stress.

Pasienter med nyresykdom kan være eksponert for medikamenter som har direkte innvirkning på metabolismen av mikronæringsstoffer. Eksempelvis er det foreslått at metotreksat kan hemme aktiviteten til riboflavin (47, 48). Lite forskning er utført innen feltet, og det ville være interessant å undersøke effekten ulike medikamenter har på nivået av vitamin B₂ hos pasienter med nyresykdom.

Ved inndeling i kjønn viste det seg at den signifikante forskjellen i nivået av riboflavin var tilstede hos menn, og ikke hos kvinner. Et annet spørsmål er derfor om hormoner knyttet til kjønn kan ha innvirkning på nivået av riboflavin. Det er også viktig å merke seg at analyse av B₂-vitaminene i blod/plasma ikke gjenspeiler lagrene i vevet, og konsentrasjonen av vitaminer i blodet hos nyrepasienter kan variere signifikant som følge av blant annet inflammasjon og fasting (48).

Tabell 13: Konsentrasjoner av FAD, FMN og riboflavin hos friske personer fra tidligere publiserte artikler, i tillegg til egne resultater (uthevet)

Prøvemateriale	FAD (nmol/L)	FMN (nmol/L)	Riboflavin (nmol/L)	Ref.
Plasma	101 (57–170) ^a	6.3 (3.3–14.1)	11 (4–34)	(45)
Plasma	74 (56–97) ^b	6.6 (4.0–11.7)	10.5 (5.4–28.4)	(13)
Plasma	63.1 (49.9–84.8) ^b	7.5 (3.3–13.4)	10.3 (4.9–38.4)	(43)
Plasma*	96.3 (36.5–157.2) ^a	12.5 (7.1–17.5)	18.5 (8.2–57.8)	(42)
Plasma	-	-	17.8 (5.5–61.6) ^c	(46)
Plasma	57.9 (44.5–78.1) ^d	7.0 (3.5–13.3)	8.6 (2.7–42.5)	(44)
Fullblod	310 (240–460) ^c	-	-	(40)
Erytrocytter	469 (351–558) ^b	44 (26–80)	Kun spor	(13)
Plasma	48.1 (36.2–68.3)^a	7.5 (1.2–25.8)	5.2 (0.8–41.9)	
Fullblod	176.7 (137.1–218.0)^a	19.4 (6.8–47.6)	1.7 (0.6–9.7)	

^a Median (range)

^b Median (10. – 90.-persentil)

^c Gjennomsnitt (range)

^d Median (5. – 95.persentil)

* Aldersgruppe 10-15 år

5.1.6.1 Sammenlikning av nivåer i plasma og fullblod

Få publikasjoner av B₂-analyser utført i fullblod er tilgjengelige, og de fleste har målt konsentrasjonen i plasma og/eller erythrocytter. Hustad et al. (13) undersøkte konsentrasjonen av FAD, FMN og riboflavin i plasma og erythrocytter, resultatene er presentert i tabell 13. Deres resultater gir en ratio mellom nivået av FAD i erythrocytter og plasma på 6.3, og ratio 6.7 for FMN. Resultatene i denne studien gir en ratio mellom nivået av FAD i fullblod og plasma i kontrollgruppen på 3.7, og ratio 2.6 for FMN. Omtrent halvert ratio mellom fullblod og plasma sammenliknet med mellom erythrocytter og plasma virker logisk, da fullblod består av omtrent 50 % plasma og 50 % erythrocytter. Hustad et al. fant kun spor av riboflavin i erythrocytter, og dette samsvarer med at nivået av riboflavin er lavere i fullblod enn i plasma i denne studien.

Speek et al. målte mediankonsentrasjonen av FAD i fullblod til 310 nmol/L (tabell 13), som er nesten det dobbelte av nivået av FAD i denne studien. Det er usikkert om forskjellene skyldes tilfeldigheter basert på ulike utvalg, men en mulig årsak til lavere nivåer i denne studien kan skyldes ufullstendig lysering av erythrocyttene. Speek et al. benyttet større mengder fullblod og TCA (10 %) samt lenger inkubasjonstid ved proteinpresipiteringen (40). I etterkant av analyse av prosjektprøvene ble det utført et forsøk der henholdsvis ddH₂O og cellelysatet CellLytic (Sigma) ble benyttet til å lysere erythrocyttene, med inkubasjonstid på henholdsvis 5, 15, 30 og 60 minutter. Forsøket viste en svak økning i B₂-konsentrasjonene ved lenger inkubasjonstid og ved bruk av CellLytic. CellLytic er kostbart, og ddH₂O ble derfor foretrukket i utgangspunktet. Ved mer tid disponibelt kunne vi gjennomført et mer omfattende forsøk på dette. Det bør likevel ikke ha innvirkning på resultatene i oppgaven, da det er forholdet mellom verdiene i pasientgruppen mot kontrollgruppen som studeres og alle prøver er behandlet likt. Et tredje alternativ for lysering av erythrocyttene kunne vært å sonikere blodprøvene.

FMN korrelerte sterkt med sin forløper riboflavin i plasma i både kontrollgruppen og pasientgruppen, mens FAD ikke korrelerte like sterkt med sin forløper FMN i plasma. Dette samsvarer med tidligere studier (13, 44). FMN og riboflavin i plasma viste begge sterk korrelasjon med FMN og riboflavin i fullblod, men mindre grad av korrelasjon ble observert for FAD. Flere studier har vist at konsentrasjonen av FAD påvirkes i mindre grad enn FMN og riboflavin ved endringer i nivået av vitamin B₂ (13).

Konsentrasjonen av B₂-vitaminer i erytrocytter blir vanligvis bestemt ved EGRAC-metoden (erythrocyte glutathione reductase activation coefficient), som angir ratioen mellom enzymaktiviteten til GR med og uten tilsetning av FAD (13). Dette er en indirekte målemetode, og det vil være en fordel dersom direkte måling av vitaminene i fullblod på sikt kan fungere som en indikator på vitamin B₂-status i kroppen.

5.2 Vitamin B₆

5.2.1 Standardkurve og linearitet

Standardkurvene viser god linearitet opp til konsentrasjonsnivåene 1000 nmol/L for PLP og 500 nmol/L for 4-PA. Linjen skjærer alle punktene i regresjonsplottene, og R²-verdiene er >0.99 (figur 14). Vi foreslår at metoden kan benyttes til kvantifisering av B₆-vitaminene innen et bredt konsentrasjonsområde med god nøyaktighet, og standardkurvene er lineære langt over forventede konsentrasjonsnivåer for PLP og 4-PA.

5.2.2 Variasjonskoeffisient

Metoden for analyse av B₆-vitaminene viser svært god presisjon, med høyeste verdi på 3.2 % (total CV (%) for PLP). Resterende verdier er fra 0.4 % til 1.4 %, hvilket er meget bra sammenliknet med resultatene fra andre metoder for analyse av B₆-vitaminer (20, 43).

5.2.3 Prøver fra prosjektdeltakere

Tabell 14 viser konsentrasjonsnivåer av PLP og 4-PA i plasma fra tidligere publiserte studier, i tillegg til egne verdier (uthevet). Mediankonsentrasjonene samsvarer bra med observerte konsentrasjonsverdier for kontrollgruppen i denne studien. Mediankonsentrasjonen av PLP var 41.8 nmol/L i kontrollgruppen og 41.6 nmol/L i pasientgruppen. Mangel på vitamin B₆ hos pasienter med kronisk nyresykdom er vanlig (49), men er ikke observert basert på kvantifisering av PLP i dette tilfellet.

Et signifikant forhøyet nivå av 4-PA ($p < 0.001$) ble observert hos pasientene med nyresykdom sammenliknet med kontrollgruppen. Tidligere studier har rapportert at konsentrasjonen av 4-PA i plasma er sterkt knyttet til nyrefunksjonen og kan øke kraftig ved nyresykdom (50). Dette kan tyde på at personer med nyresykdom har økt nedbrytning av

vitamin B₆. Samsvarende observasjoner er blant annet gjort av Coburn et al. (51). Det er også vist at plasmanivået av 4-PA øker kraftig etter inntak av B₆-supplement (50). Mann-Whitney U test viste ingen signifikant forskjell i nivået av 4-PA hos personer som tok B-vitamin supplement sammenliknet med personer som ikke tok supplement, hverken i kontrollgruppen (p = 0.142) eller pasientgruppen (p = 0.329).

Mekanismene for reguleringen av de mange enzymene som deltar i metabolismen av vitamin B₆ er ennå ikke avklart, og det er usikkert om aktiviteten til enzymene som deltar i nedbrytningen av vitamin B₆ er endret hos pasienter med kronisk nyresykdom (52). Økt nivå av 4-PA kan også skyldes redusert filtrering og utskillelse gjennom urinen. Til tross for at B₆-vitaminene er vannløselige, kan store doser føre til perifer nevropati. I et forsøk utført på rotter rapporterte Levine et al. (53) at redusert utskillelse av B₆-metabolittene kan øke sannsynligheten for toksisitet. Det var ingen signifikant forskjell i plasmanivået av PLP mellom pasientgruppen og kontrollgruppen i denne studien, og dette påpeker viktigheten av å undersøke konsentrasjonen av flere B₆-derivater for å få et fullstendig bilde av vitaminstatus.

Tabell 14: Konsentrasjoner av PLP og 4-PA hos friske personer fra tidligere publiserte artikler, i tillegg til egne konsentrasjonsverdier (uthevet)

Prøvematriks	PLP (nmol/L)	4-PA (nmol/L)	Ref.
Plasma	40.6 (8.4–165.0) ^a	17.5 (3.7–114.79)	(20)
Plasma	34.4 (17.0–102.3) ^b	22.4 (11.2–88.0)	(43)
Plasma	52.0 (19.0–194.0) ^a	-	(54)
Plasma	41.8 (8.9–142.0)^a	19.4 (7.3–48.0)	

^a Median (range)

^b Median (10. – 90. persentil)

PLP korrelerte sterkt med 4-PA i plasma i kontrollgruppen, og noe svakere med 4-PA i pasientgruppen. Sterk korrelasjon mellom PLP og 4-PA er også observert i tidligere studier (50). I tillegg korrelerte FMN sterkt med PLP både i kontrollgruppen og pasientgruppen. FMN er som kjent koenzym for enzymet pyridoksin-5'-fosfat oksidase (PNPO), som katalyserer omdannelsen av PNP og PMP til PLP (18).

5.3 Potensielle feilkilder og utfordringer generelt

HPLC-metoden for analyse av vitamin B₂ og B₆ opererer med lave konsentrasjonsnivåer (nmol/L), hvilket gjør systemet svært følsomt for forurensninger. Forkolonner med filtre var montert til de analytiske kolonnene for å fange opp uønskede partikler, og filtrene ble skiftet jevnlig for å unngå forstyrrelser i kromatogrammene.

Ved oppstart av analyse av vitamin B₆ dukket det opp en interfererende topp i kromatogrammene etter tillaging av ny buffer. Reagenskolbene som ble benyttet for tillaging ble skylt i ddH₂O før bruk, men toppen forsvant først når reagenskoblene ble skylt i ACN etterfulgt av ddH₂O. Den interfererende toppen kan skyldes såperester eller andre forbindelser som kun lot seg fjerne ved bruk av organisk løsemiddel, og dette er viktig å være oppmerksom på.

Manuell proteinpresipitering og tillaging av bufferløsninger gir rom for feil, eksempelvis feil ved merking og overføring til sekundærrør/tertiærrør, feil bruk av eller unøyaktig pipettering og unøyaktig veiing av salter til bufferløsningene. Det er derfor svært viktig å være nøyaktig, fokusert og opparbeide seg gode rutiner slik at dette usikkerhetsmomentet reduseres til et minimum. Bruk av multipipette reduserer usikkerheten knyttet til dette, i tillegg til trening i bruk av pipette i forkant av arbeid med prøvene.

5.4 Konklusjon

En HPLC-metode er optimalisert for måling av B₂-vitaminene. Sammenliknet med metoden til Speek et al. har vi redusert mengden biologisk prøvemateriale, reagenser til proteinpresipitering samt analysetid som gir økt effektivitet. Metoden er rimelig og krever lite prøvemateriell sammenliknet med eksempelvis LC-MS/MS.

Metoden måler konsentrasjonsnivået av endogent FAD, FMN og riboflavin med god presisjon og nøyaktighet. I motsetning til funksjonelle tester måles konsentrasjonen av B₂-vitaminene direkte i blodet ved denne metoden, som gir et mer pålitelig bilde av vitaminstatus i kroppen.

I denne studien fant jeg ut at pasientgruppen hadde et signifikant høyere nivå av riboflavin både i plasma ($p = 0.036$) og fullblod ($p = 0.025$) sammenliknet med kontrollgruppen. En mulig årsak er endret metabolisme av riboflavin. I tillegg var nivået av 4-PA signifikant høyere hos pasientgruppen ($p < 0.001$) sammenliknet med kontrollgruppen. Økt nivå av 4-PA hos pasienter med kronisk nyresykdom er observert i enkelte tidligere studier, og kan skyldes økt katabolisme eller redusert ekskresjon. Dette kan øke sjansen for vitamin B₆-toksisitet.

Litteraturliste

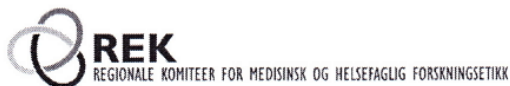
1. Combs GF. Riboflavin. I: Combs GF, red. The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health; vol. 3. USA: Elsevier Academic Press; 2008. s. 281-287.
2. Dierkes J, Nygård O. B vitamins and Disease. I: Preedy VR, red. B vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects; vol. 4. UK: The Royal Society of Chemistry; 2013. s. 21-31.
3. Ahmed F. B Vitamins and folate in multiple micronutrient Intervention: function and effects. I: Preedy VR, red. B Vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects; vol. 4. UK: The Royal Society of Chemistry; 2013. s. 524-533
4. Golbach JL et al. Riboflavin in nutrition, food processing, and analysis - a review. JFR. 2014;3(6):23-35.
5. Monteiro MC, Perrone D. Chemistry and biochemistry of riboflavin and related compounds. I: Preedy VR, red. B Vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects; vol. 4. UK: The Royal Society of Chemistry; 2013. s. 93-105.
6. Zielinska-Dawidziak M. Riboflavin uptake. I: Preedy VR, red. B vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects; vol. 4. UK: The Royal Society of Chemistry; 2013. s. 592-607.
7. Henriques BJ, Rodrigues JV, Gomes CM. Riboflavin and beta-oxidation flavoenzymes. I: Preedy VR, red. B vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects; vol. 4. UK: The Royal Society of Chemistry; 2013. s. 611-629.
8. Rutter J, Winge DR, Schiffman JD. Succinate dehydrogenase - assembly, regulation and role in human disease. Mitochondrion. 2010;10(4):393-401.
9. Mansoor M et al. Plasma total homocysteine response to oral doses of folic acid and pyridoxine hydrochloride (vitamin B6) in healthy individuals. Oral doses of vitamin B-6 reduce concentrations of serum folate. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1999;59(2):139-146.
10. Hustad S, Schneede J, Ueland PM. Riboflavin and methylenetetrahydrofolate Reductase. Landes Bioscience [elektronisk artikkel]. 2000 [hentet 2018-04-16]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6145/>
11. Skoupy S et al. Riboflavin is a determinant of total homocysteine plasma concentrations in end-stage renal disease patients. Clin J Am Soc Nephrol. 2002;13(5):1331-1337.
12. Ashoori M, Saedisomeolia A. Riboflavin (vitamin B2) and oxidative stress: a review. Br J Nutr. 2014;111(11):1985-1991.
13. Hustad S et al. Riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in human plasma and erythrocytes at baseline and after low-dose riboflavin supplementation. Clin Chem. 2002;48(9):1571-1577.
14. Sokac et al. The chemistry and biochemistry of vitamin B6: synthesis of novel analogues of vitamin B6. I: Preedy VR, red. B vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects; vol. 4. UK: The Royal Society of Chemistry; 2013. s. 135-143.
15. Hayashi H. Historical context of vitamin B. I: Preedy VR, red. B vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects; vol. 4. UK: The Royal Society of Chemistry; 2013. s. 3-17.
16. Midttun Ø et al. Multianalyte quantification of vitamin B6 and B2 species in the nanomolar range in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Clin Chem. 2005;51(7):1206-1216.

17. Yagi T. Enzymatic HPLC assay for all six vitamin B6 forms. I: Preedy VR, red. B vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects; vol. 4. UK: The Royal Society of Chemistry; 2013. s. 335-350.
18. Musayev FN et al. Structure and properties of recombinant human pyridoxine 5'-phosphate oxidase. *Protein Sci.* 2003;12(7):1455-1463.
19. Ishihara J, Iso H. Function and effects of pyridoxine (vitamin B6): an epidemiological review of evidence. I: Preedy VR, red. B vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects; vol. 4. UK: The Royal Society of Chemistry; 2013. s. 699-710.
20. Cabo R et al. A simple high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the measurement of pyridoxal-5-phosphate and 4-pyridoxic acid in human plasma. *Clinica Chimica Acta.* 2014;10(433):150-156.
21. Mansoor MA, Vefring H, Kristensen O. Homocystein - en uavhengig risikofaktor for prematur karsykdom. *Tidsskr Nor Lægefor.* 1996;14(116):1663-1667.
22. Antonopoulos AS, Shirodaria C, Antoniadis C. Vitamins and folate fortification in the context of cardiovascular disease prevention. I: Preedy VR, red. B vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects; vol. 4. UK: The Royal Society of Chemistry; 2013. s. 35-51.
23. van Guldener C, Stam F, Stehouwer CD. Homocysteine metabolism in renal failure. *Kidney Int Suppl.* 2001;59(78):234-237.
24. Yoshikawa T, Naito Y. What is oxidative stress? *Japan Med Assoc J.* 2002;45(7):271-276.
25. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89-96.
26. Wu G et al. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004;134(3):489-492.
27. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother.* 2003;57(4):145-155.
28. Holck P. Nyre [Internett]. Store medisinske leksikon; [hentet 2018.02.19]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/nyre>
29. Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med.* 2009;60:321-337.
30. Os I, Hartmann A. Glomerulonefritt [Internett]. Store medisinske leksikon; [hentet 2018.02.19]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/glomerulonefritt>
31. Os I. Ig A Nefritt [Internett]. Store medisinske leksikon; [hentet 2018.02.19]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/IgA-nefritt>
32. Sung CC et al. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:1-15.
33. Stampfer MJ et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA.* 1992;268(7):877-881.
34. Shimakawa T et al. Vitamin intake: a possible determinant of plasma homocyst(e)ine among middle-aged adults. *Ann Epidemiol.* 1997;7(4):285-293.
35. Jacques PF et al. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(3):613-621.
36. Mansoor MA. Liquid Chromatography. eLS [elektronisk artikkel]. 2015 Jun [hentet 2017.08.27];3:1-7. Tilgjengelig fra: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0002679.pub3>

37. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Analytical techniques. I: Brittain M, red. Clinical chemistry: techniques, principles, correlations; vol. 6. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2010. s. 147-150.
38. Bird IM. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *BMJ*. 1989;299(6702):783-787.
39. Tariq A et al. Systemic redox biomarkers and their relationship to prognostic risk markers in autosomal dominant polycystic kidney disease and IgA nephropathy. *Clin Biochem* [elektronisk artikkel]. 2018 Apr [hentet 2018.04.26];3:1-7. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29655960>
40. Speek AJ et al. Determination of the B2 vitamer flavin-adenine dinucleotide in whole blood by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *J Chromatogr*. 1982;228:311-316.
41. Akimoto M et al. Conversion of FAD to FMN and riboflavin in plasma: effects of measuring method. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(8):1779-1782.
42. Capo-chichi CD et al. Analysis of riboflavin and riboflavin cofactor levels in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 2000;739(1):219-224.
43. Midttun Ø et al. Multianalyte quantification of vitamin B6 and B2 species in the nanomolar range in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2005;51(7):1206-1216.
44. Hustad S, Ueland P, Schneede J. Quantification of Riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in human plasma by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Clin Chem*. 1999;45(56):862-868.
45. Vasilaki AT et al. Relation between riboflavin, flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide concentrations in plasma and red cells in patients with critical illness. *Clin Chim Acta*. 2010;411(21-22):1750-1755.
46. Petteys BJ, Frank EL. Rapid determination of vitamin B2 (riboflavin) in plasma by HPLC. *Clin Chim Acta*. 2011;412(1):38-43.
47. Bebel Stargrove M, Treasure J, L. McKee D. Vitamin. I: White K, red. Herb, nutrient and drug interactions: clinical implications and therapeutic strategies. Missouri: Elsevier; 2008. s. 263-280.
48. Jankowska M, Rutkowski B, Dębska-Ślizień A. Vitamins and microelement bioavailability in different stages of chronic kidney disease. *Nutrients*. 2017;9(3):282.
49. Kalle S et al. 4-pyridoxic acid in the spent dialysate: contribution to fluorescence and optical monitoring. *PLoS ONE* [elektronisk artikkel]. 2016 Sep [hentet 2018.03.11];11(9). Tilgjengelig fra: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0162346>
50. Ueland PM et al. Direct and functional biomarkers of vitamin B6 status. *Annu Rev Nutr*. 2015;35:33-70.
51. Coburn SP et al. Elevated plasma 4-pyridoxic acid in renal insufficiency. *Am J Clin Nutr*. 2002;75(1):57-64.
52. Mooney S et al. Vitamin B6: a long known compound of surprising complexity. *Molecules*. 2009;14(1):329-351.
53. Levine S, Saltzman A. Pyridoxine (vitamin B6) toxicity: enhancement by uremia in rats. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(10):1449-1451.
54. Vasilaki AT et al. Relation between pyridoxal and pyridoxal phosphate concentrations in plasma, red cells, and white cells in patients with critical illness. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(1):140-146.

Vedlegg

Vedlegg 1: REK-godkjenning



Region: REK vest	Saksbehandler: Camilla Gjerstad	Telefon: 55978499	Vår dato: 10.04.2014	Vår referanse: 2014/318/REK vest
			Deres dato: 04.03.2014	
Vår referanse må oppgis ved alle henvendelser				

Terje Apeland
Nyreseksjonen
Stavanger universitetssjukehus

2014/318 Redox-status hos pasienter med nyresykdom

Forskningsansvarlig: Helse Stavanger HF
Prosjektleder: Terje Apeland

Vi viser til søknad om forhåndsgodkjenning av ovennevnte forskningsprosjekt og ettersendt revidert informasjonsskriv. Søknaden ble behandlet av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK vest) i møtet 27.03.2014. Vurderingen er gjort med hjemmel i helseforskningsloven (hfl.) § 10, jf. forskningsetikklovens § 4.

Prosjektomtale

Pasienter med kronisk nyresykdom har økt nivå av reaktive oksygenforbindelser og kan få en tilstand med oksidativt stress. Det ser ut som om graden av oksidativt stress kan ha betydning for hastighet i sykdomsutviklingen. Oksidativt stress kan utvikle seg på forskjellig måte ved ulike nyresykdommer. Prosjektet vil undersøke pasienter med arvelig polycystisk nyresykdom samt pasienter med IgA-nyrebetennelse og sammenlikne disse med friske kontrollpersoner. Forskerne vil blant annet undersøke diett, hastighet på sykdomsgrad og progresjon. Studien vil også se på betydningen av ulike genetiske enzymer for evnen til å motstå oksidativt stress. Deltakerne er pasienter ved poliklinikk for nyresykdommer ved Stavanger universitetssjukehus. Studien vil rekruttere voksne pasienter med kjent polycystisk nyresykdom og pasienter med biopsiverifisert IgA-nefritt. Pasienter med polycystisk nyresykdom og pasienter med IgA-nefritt har trolig ulik årsak til redox-forstyrrelser. Som kontrollgruppe vil man rekruttere ansatte ved sykehuset, blodgivere, personer fra egen bekjentskapskrets og friske personer som kommer i kontakt med nyrepoliklinikken. Deltakelsen innebærer å avgi blod- og urinprøve, måle blodtrykk og besvare et spørreskjema om diett. Relevante journalopplysninger vil også samles inn. 180 deltakere vil bli rekruttert til studien.

Vurdering

Forsvarlighetsvurdering

Komiteen finner studien forsvarlig å gjennomføre, og deltakelsen innebærer liten ulempe for forsøksdeltakerne.

Informasjonsskriv

Det er utarbeidet et informasjonsskriv som er rettet både mot pasient- og kontrollgruppen. REK Vest ber om at forespørselen inkluderer informasjon om at relevante opplysninger om nyrediagnose og nyrefunksjon fra journal vil bli benyttet i studien. REK har ellers ingen innvendinger mot informasjonsskrivet.

Tidligere godkjent generell forskningsbiobank

Besøksadresse:
Armauer Hansens Hus (AHH),
Tverrfly Nord, 2 etasje. Rom
281. Haukelandsveien 28

Telefon: 55975000
E-post: rek-vest@uib.no
Web: <http://helseforskning.etikk.com.no/>

All post og e-post som inngår i saksbehandlingen, bes adressert til REK vest og ikke til enkelte personer

Kindly address all mail and e-mails to the Regional Ethics Committee, REK vest, not to individual staff

Blod- og urinprøver vil bli lagret i en tidligere godkjent generell forskningsbiobank 2013/1286 *Nefrologisk forskning i Stavanger* der ansvarshavende er Terje Apeland. Materialet vil senere bli benyttet til forskning i fremtidige prosjekter etter nye søknader til REK. Det skal gjøres genetiske undersøkelser av biologisk materiale. De genetiske opplysningene vil i følge prosjektleder ikke tilbakeføres til deltakeren og vil heller ikke få noen betydning i den medisinske behandlingen av den enkelte deltaker. REK finner derfor at bioteknologiloven ikke kommer til anvendelse i prosjektet. Dersom det er sannsynlig at analysene likevel kan gi prediktiv informasjon (f.eks. ved utilsiktede funn) eller analysene som kan ha betydning for deltakernes behandling eller diagnostikk, må det sendes endringsøknad til REK.

Prosjektslutt

I følge søknaden vil data oppbevares sammen med personidentifikasjon etter prosjektslutt med tanke på en mulig etterundersøkelse. I følge helseforskningsloven § 38 må imidlertid data slettes eller anonymiseres ved prosjektslutt, evt. kan data oppbevares i inntil fem år etter prosjektslutt av etterkontrollhensyn. REK Vest godkjenner lagring av aidentifiserte opplysninger frem til 01.12.20. REK minner om at opplysningene skal behandles i aidentifisert form der opplysningene må oppbevares adskilt fra koblingsnøkkelen. Dersom det viser seg å bli behov for forlengelse av prosjektet, kan det søkes REK om prosjektendring. Vi gjør oppmerksom på at dersom det isteden er behov for opprettelse av et register for lagring av pasientopplysninger for fremtidig forskning etter at prosjektet er avsluttet, skal det søkes personvernombudet/Datatilsynet.

Vilkår

Forespørselen må inkludere informasjon om at relevante opplysninger fra journal vil bli benyttet i studien.

Vedtak

REK Vest godkjenner prosjektet på betingelse av at ovennevnte vilkår tas til følge.

Sluttmelding og søknad om prosjektendring

Prosjektleder skal sende sluttmelding til REK vest på eget skjema senest 01.06.2016, jf. hfl. 12. Prosjektleder skal sende søknad om prosjektendring til REK vest dersom det skal gjøres vesentlige endringer i forhold til de opplysninger som er gitt i søknaden, jf. hfl. § 11.

Klageadgang

Du kan klage på komiteens vedtak, jf. forvaltningslovens § 28 flg. Klagen sendes til REK vest. Klagefristen er tre uker fra du mottar dette brevet. Dersom vedtaket opprettholdes av REK vest, sendes klagen videre til Den nasjonale forskningsetiske komité for medisin og helsefag for endelig vurdering.

Med vennlig hilsen

Ansgar Berg
Prof. Dr. med
komitéleder

Camilla Gjerstad
rådgiver

Kopi til: forskning@sus.no; biobankregisteret@fhi.no

Vedlegg 2: Rådata HPLC-resultater

Pasient nr	Plasma FAD	Plasma FMN	Plasma RF	Blod FAD	Blod FMN	Blod RF	Plasma PLP	Plasma 4-PA
p1	43,5244368	28,3453148	45,9575224	175,4703867	32,5659833	12,5543909	36,3919826	31,8990792
p2	47,9836904	3,8639652	2,790118	177,8863004	11,7279906	0,8799579	44,6241335	35,3847548
p3	68,3017968	8,4659357	3,865591	152,3193211	14,2158962	0,9539133	33,5739607	11,8490843
p4	45,0595524	5,4692786	12,7569649	179,0560094	24,1436319	2,2337657	34,0860759	34,3896849
p5	51,6597324	9,6955979	5,9993515	172,6239442	19,2125635	0,7899423	52,6555736	36,6936243
p6	51,5989295	11,1559707	4,7681916	165,1464489	22,1447713	0,8300386	30,2221557	34,0848603
p7	36,4325383	7,9196934	2,6202155	147,4256388	21,2136795	0,8925789	78,5140796	42,2825462
p8	44,4704072	7,8312099	15,4376975	168,7166124	19,0644662	4,0482267	34,4595905	16,3553415
p9	42,8013671	15,062034	13,2280745	181,5782522	42,1985346	4,1432547	60,5036887	123,9964675
p10	57,7031554	7,529156	8,2084062	167,9099024	14,224242	1,0994869	35,4084216	16,0841639
p11	55,5282703	5,7007366	7,3277089	164,0636893	11,71219	1,3363625	39,4496325	16,0855188
p12	54,8255216	11,8161048	4,5761428	155,4312981	19,1778837	2,132406	24,0780378	32,2598868
p13	52,9319002	5,8180335	25,6141378	207,7345103	85,3474097	4,9605383	56,3419476	119,2123907
p14	53,0577247	3,2013947	10,9918869	179,8918272	32,4481122	3,2991121	21,2881808	80,2229105
p15	49,0826522	7,886539	1,96321	170,5401264	10,8298264	1,6257879	83,7517551	53,2657994
p16	55,0979475	5,7001365	4,9406563	159,9912993	18,6123806	2,161877	40,3546446	36,082196
p17	53,5827236	2,9927049	13,2223479	171,1367733	44,0186191	1,271324	22,3504187	38,487769
p18	37,317422	7,8342722	13,9200848	182,4751162	20,3918479	3,8552262	31,5332737	19,4097299
p19	43,4431006	5,9827058	4,1160318	164,2862898	25,6211232	1,1023097	78,6426066	31,0519157
p20	47,5433276	5,8266447	1,7983651	154,6693073	10,5118552	1,0228846	17,8416621	14,4328263
p21	48,8946003	3,1162208	24,7290735	224,9827622	42,5311196	5,3879911	41,7880856	69,4291564
p22	52,580802	10,6132574	18,103634	186,677079	24,6227562	8,8769029	50,181804	33,344352
p23	62,7074263	5,7555354	1,8799916	203,6254539	7,4124786	1,7194879	55,7945937	36,647022
p24	44,3934245	5,7241684	3,3020248	194,8870277	14,9413753	2,4310885	71,7311126	19,0679992
p25	42,5933662	16,6812461	30,69988	217,7705645	32,1654657	8,962229	87,9261024	36,0829216
p26	44,8258347	13,5461557	41,9155709	200,8603522	37,3460153	9,7284645	46,069279	20,5166684
p27	45,8881886	1,612416	4,4213378	175,0525306	12,7084775	1,6688597	20,3559128	11,8803735
p28	55,8142934	3,7482583	5,1669903	174,9229314	15,2733222	2,5786633	28,2665944	29,4897954
p29	43,8671699	5,7836825	5,5308108	160,9928028	17,5723508	1,9545426	69,7569921	34,9447287
p30	41,4105742	9,2445596	5,6722763	172,9529679	20,5748785	2,7025681	43,7326202	12,516567
p31	52,1567769	13,0308343	8,4616042	229,1916002	23,5980524	2,100599	41,1793957	20,8868575
p32	53,1618442	1,2298715	5,4392055	192,8688807	8,9734931	1,678703	25,5969302	25,7682373
p33	57,0364572	5,6866996	5,7182208	196,2163314	23,9356839	1,8803943	33,9550278	28,073156
p34	55,8501058	2,5799012	4,3887143	215,5891675	17,4836814	1,646363	51,447198	23,3312246
p35	56,3133684	3,9062976	3,90117	180,6071347	14,9486303	1,3458168	50,271688	21,748731
p36	45,9927616	1,9753114	2,8941622	168,5814822	9,0585804	1,7250962	42,4934422	24,6085496
p37	51,6466792	5,425977	2,5350514	162,3372374	16,4895462	1,3029169	65,6175742	28,1540656
p38	47,0506174	5,3547891	3,8506783	205,9470357	19,0202313	1,6460147	32,6397796	20,0573758
p39	42,4135122	6,4596023	6,7224073	179,9212219	14,7076708	2,088694	68,4190065	18,4748523

Pasient nr	Plasma FAD	Plasma FMN	Plasma RF	Blod FAD	Blod FMN	Blod RF	Plasma PLP	Plasma 4-PA
p40	52,4066262	3,2203443	9,2376764	197,1682007	23,3769345	2,6575715	58,1066993	54,4472176
p41	53,2746932	3,7730875	5,0325735	182,4864526	20,5877895	1,9951242	54,7719685	47,0916055
p42	59,4966606	7,114448	2,5785225	172,2300951	16,9102611	1,5967931	84,7631727	18,1294218
p43	43,1810275	3,0637893	4,4879955	175,8238253	16,8739019	1,1253614	19,7812805	26,6515611
p44	45,6828916	4,0547587	3,3975765	162,4909192	16,9066222	1,0534624	23,1848555	16,4418577
p45	56,6725619	2,1713217	14,0902379	168,5360593	24,939622	2,440458	20,4096341	33,9623008
p46	57,2643349	4,5117524	4,584199	161,3946231	20,7434828	1,3016142	38,3982723	14,2074727
p47	46,3746115	6,710966	11,0961896	188,8461739	21,6398033	3,4080562	42,0084617	44,901573
p48	51,8157815	6,6257052	5,4236535	158,95762	19,4474542	1,5351365	19,0446201	17,5507047
p49	49,4531878	3,2198449	5,8607035	207,7671545	19,8151995	1,2785819	19,5944835	10,3983375
p50	51,2867696	9,3564472	7,3010695	174,7900327	17,5284314	1,6323786	64,0125223	17,4707018
p51	42,2763739	3,2284081	3,4937729	157,895991	14,3094358	1,27315	32,7284328	19,4671156
p52	53,058913	10,665787	7,4205447	176,2125864	21,1880175	1,1358875	46,0178712	18,1733096
p53	44,4275484	7,8601782	9,5456925	203,4728649	26,7724775	1,4040358	27,8678193	13,8000541
p54	61,8345651	5,1363505	12,0926379	177,0832798	29,1975315	3,7713558	61,7407013	63,7729374
p55	40,1602597	11,1138868	83,7477979	174,8820952	38,9053673	23,4172101	31,1709422	32,7193595
p56	36,7265204	3,1866317	3,2756833	180,5944047	7,1748426	1,2164246	15,4141461	9,429376
p57	49,4762053	7,7621409	5,9567288	158,8693192	21,4332946	2,1418961	39,8060955	27,0460526
p58	48,1264914	8,4550563	6,1886339	143,6707519	12,5993123	4,4952381	40,1407396	27,8786086
p59	41,5658208	13,5520258	7,8475778	211,5841843	20,979602	2,5621258	45,5738738	23,958946
p60	47,4311229	9,7049419	7,367785	187,537758	15,4423619	3,3097567	47,5396852	46,2843235
p61	46,0077212	14,4693707	13,3371645	188,8161595	64,1683902	3,2198958	33,3677889	22,7018371
p62	51,0849533	4,6440681	11,0962857	237,7036798	26,8033191	3,0955215	19,0993972	32,7353476
p63	47,5503312	12,6959475	10,8215024	161,163279	17,408502	3,6996836	51,4200355	46,1582465
p64	41,957123	13,9421715	16,5855397	191,1881645	48,836269	5,3225551	277,739156	130,7015313
p65	54,3991391	11,0298403	7,8437636	170,2725163	23,666667	1,7848846	56,3849487	36,22795
p66	47,0550133	6,4782357	2,3215523	153,8503493	11,8224297	1,0008335	43,7576137	22,9127146
p67	55,1115502	4,1347192	3,3300374	147,5105498	10,8102955	1,251025	13,874074	38,7387711
p68	54,0341779	10,0631274	15,2564534	194,0486947	18,5424084	4,7942144	52,9449331	23,2456603
p69	53,4433627	12,4331962	11,1051754	200,7405887	16,9418969	4,471498	65,0066954	114,3359472
p70	57,4484335	4,4866725	9,1986847	177,4036176	12,6095962	1,7513262	22,2666809	40,7364555
p71	48,3617749	18,4661277	20,1732174	170,3858422	39,3273326	6,1981486	33,210465	46,5983555
p72	50,183116	5,6608113	6,785662	189,8513379	28,0101168	1,0496644	13,2729818	16,0822856
p73	52,9056084	1,8832328	1,0476653	147,571638	8,1148608	0,8087234	74,6538301	161,5931016
p74	50,3561136	9,0774323	11,3668449	176,2981105	36,1389128	1,972862	34,3920784	57,6720673
p75	40,9363118	5,0508497	1,6735313	158,8814567	14,2246941	0,8458565	33,7444167	18,6117587
p76	39,07146	8,4056864	12,617724	172,2872589	20,2375841	3,8148017	40,175175	19,1428844
p77	51,5077257	1,6294553	2,6310791	191,4944271	15,5303846	0,792429	27,1703574	24,4342391
p78	40,1752677	9,146762	8,3911002	148,5042716	12,3775649	3,7198078	44,3468013	18,8761898
p79	36,7896976	8,9239089	4,2305279	165,1361526	18,2150642	1,4254687	47,9833486	10,6971889
p80	47,4297995	6,0872893	2,5932038	162,6487554	19,7819183	1,2685875	20,8062014	36,8093856

Pasient nr	Plasma FAD	Plasma FMN	Plasma RF	Blod FAD	Blod FMN	Blod RF	Plasma PLP	Plasma 4-PA
p81	63,6747115	6,9600751	8,1949243	217,9727431	47,6216896	2,9603216	46,9743699	17,2866356
p82	56,5572248	1,3822973	5,7125714	178,7084885	22,2974622	1,0576923	19,919784	42,2499445
p83	48,0512445	9,3854996	4,3126081	204,7354604	25,5745818	1,5155167	43,1246171	16,284655
p84	61,7189081	11,4125656	23,4736649	184,2477689	25,1660077	5,2978388	44,3431534	25,056055
p85	45,6534734	7,9857331	15,3243892	170,0944599	26,1067861	3,1863998	30,215151	8,4101258
p86	47,590005	6,2742907	3,127159	162,4793935	15,5190381	1,5073845	44,5635808	18,9496753
p87	60,7947843	5,0087783	2,3536595	191,1996684	20,5820806	0,6286556	26,1893247	16,5922693
p88	57,2499013	7,358141	5,9744804	147,7296476	11,5336838	2,3115459	21,876939	14,5534129
p89	49,9600039	9,5984557	5,7866926	186,856752	19,0410728	2,2224614	27,7286453	13,0803479
p90	57,8968747	5,812053	9,8783593	173,963448	22,8457469	1,8112075	32,322264	36,8024007
p91	49,3426541	4,4184637	2,6675355	153,4813925	16,4682213	0,9232509	25,95993	7,2763586
p92	44,2620747	10,1247359	8,2133171	191,1594741	28,2528765	2,4449076	55,833986	20,7627872
p93	51,685827	7,5640641	3,6056762	168,0517681	22,539498	0,7712715	51,4964459	21,6868679
p94	45,9330351	3,0864677	4,317028	156,5060783	14,6879297	1,0663793	35,1837846	11,8942758
p95	53,2760472	4,5788991	8,2119491	196,7662464	19,0179892	1,5818814	17,131901	14,784728
p96	36,4789525	21,6688529	28,3135466	139,4789728	28,1684889	7,039025	41,8936915	25,3088174
p97	53,7457228	10,9127966	3,4650846	178,4888236	14,885322	2,0673733	35,3273699	18,7573692
p98	37,1767136	4,9836546	7,5704397	177,135814	17,7699642	2,3871208	22,9283864	12,4447539
p99	53,7638349	5,1434927	4,1951553	188,574399	19,6834757	1,419554	47,934807	32,5310751
p100	38,6002721	5,1700177	4,2269691	172,0662701	28,3649594	0,9829065	55,5419406	27,6579595
p101	51,3602218	13,2738655	6,7069884	176,250134	22,1435366	2,5201426	60,3228012	20,3071204
p102	40,489768	15,0761855	6,880375	184,3936439	20,7302936	3,1115594	51,2071715	21,0881922
p103	38,2340009	9,2742091	8,6726025	156,6076186	10,8399186	3,0763949	81,9629568	21,511455
p104	47,1860393	4,4832417	6,6205484	181,3407287	15,7249133	2,2587265	28,4435944	27,4732853
p105	43,4147322	7,2396715	7,0041065	159,9866794	14,0876306	2,6986832	25,0012535	11,525834
p106	49,0658374	5,0185476	5,4290248	158,2028694	11,5478131	2,2500174	39,8137811	17,2246793
p107	49,7148588	7,4052699	4,7823665	163,4886493	12,6117774	2,061268	74,3663015	29,400183
p108	49,673343	10,0297951	4,2652433	182,8627474	20,2050079	1,4717289	44,5904188	19,3797516
p109	40,9260217	16,3699761	5,1295922	164,2317702	26,0827623	3,2530869	51,9777775	15,3926991
p110	46,4645855	10,9976928	19,3595362	182,5342989	28,5076553	6,9924841	44,8078819	29,5927259
p111	51,5246945	1,2369945	0,8059819	153,8231216	6,7732977	0,9578645	8,8654818	7,5534299
p112	58,7263332	4,7090151	3,7838064	194,3639537	16,3243264	1,2567028	36,300116	14,2509107
p113	39,8516995	15,9987034	7,3492782	167,7364648	28,1060417	1,7396006	26,0492562	17,1253405
p114	52,0601072	8,1608955	5,3356123	183,4897513	36,726217	1,569095	70,5051051	19,5173883
p115	45,802315	7,5032676	5,2849039	137,0595523	15,5753958	2,1157255	28,8475668	20,0878738
p116	45,4005776	2,6413756	3,1656574	186,7259217	8,2573243	1,6009776	22,9322148	23,2065572
p117	53,4127189	8,7693381	4,3465004	161,3174734	18,9556081	1,7904645	82,031281	27,0104883
p118	44,4797689	12,2358808	7,0806151	173,0686046	23,2934779	2,9626313	53,0314833	13,6768589
p119	50,2304899	12,1974465	6,9620139	163,038121	27,6689934	4,195489	48,1911464	20,1650315
p120	39,8797116	3,2533878	2,9056136	171,0454329	13,5324804	1,6744146	39,2279594	22,9357432
p121	36,1889884	2,3388183	4,3747599	167,0142334	20,3352687	1,7325613	22,0849185	20,2189234

Pasient nr	Plasma FAD	Plasma FMN	Plasma RF	Blod FAD	Blod FMN	Blod RF	Plasma PLP	Plasma 4-PA
p122	51,9198528	8,6728575	6,7703534	174,6838367	21,8490819	2,1744672	58,1201251	25,8672163
p123	49,7236794	6,493455	2,3238043	172,3062921	19,0225597	0,9396135	55,1836042	21,9279292
p124	44,7340221	12,502521	4,2876432	193,9229224	22,1709744	2,6415481	50,7024043	18,8451054
p125	44,4564764	4,3669726	2,2423608	150,7751748	11,8612568	1,7981529	31,4873895	18,3110107
p126	40,8991901	8,0675211	13,680787	205,2304557	35,6466124	4,5241146	67,7697386	20,9819319
p127	38,4700025	3,8748457	7,5490107	172,106518	15,2752645	2,7319776	30,0334573	15,0842761
p128	51,0258941	3,8443768	3,2008208	191,9606623	24,2812156	1,3275145	41,6831901	16,6119807
p129	39,7255735	5,6375435	4,2303911	179,2640298	9,8123815	1,2530208	24,9308814	23,6477718
p130	50,5414484	25,8019622	20,0606462	157,037435	26,415034	5,6103777	42,551949	22,7323884
p131	48,5969608	6,8967863	4,0830883	180,2944716	25,4289019	1,9748234	35,0200683	24,5018709
p132	50,1709029	8,1982899	4,5791481	190,9958905	22,4791883	1,905703	43,1446819	18,9819987
p133	48,2152482	8,0419372	3,5755476	199,2093417	21,3841655	1,9817552	54,9345115	33,2494845
p134	41,6003906	6,3342906	10,091373	183,5046351	19,2861746	3,233556	21,8383321	11,435452
p135	48,8902482	10,5574462	4,9381936	188,6229088	28,0604732	2,0722405	86,3054036	27,5425821
p136	52,1801387	8,008077	6,1257111	154,3780777	23,6405935	1,4435024	59,0582711	17,9795376
p137	51,0742415	6,7096782	3,1398815	160,3151442	14,9098696	1,2272741	38,4670189	9,2754676
p138	37,7350481	8,8839612	9,1793792	179,0273513	24,1095125	1,7387735	68,0823304	20,8007523
p139	47,8302878	9,6048177	7,5807704	188,8456851	31,2626823	3,3034778	141,9833309	48,0196272
p140	48,4064794	5,3339598	1,6379797	176,346145	9,0938985	1,4068736	38,4847386	18,6659125
p141	45,9477675	1,799666	1,7278018	180,037873	10,8134432	0,6057951	45,478429	18,2460729
p142	53,8068681	11,0921722	7,5448604	168,8853269	32,4585372	2,7387664	58,0984441	38,1130219
p143	44,3375801	1,3797736	1,4964176	172,5412339	10,738751	1,2870589	10,7038503	14,836633
p144	38,6187755	3,9372482	2,3996229	189,1381703	13,9170334	1,4041805	24,4938693	17,367573
p145	-							
p146	45,3684824	5,7954543	2,4612475	195,2038649	24,1858258	0,6119722	49,8420647	21,404116
p147	48,0130325	7,5944424	7,049345	212,9644891	30,0442187	1,0033529	39,0394143	20,7312063
p148	47,495372	15,7435651	6,1124887	243,8762949	40,6142806	1,6253812	33,3294914	64,8690842
p149	50,2716318	3,5008571	7,6305064	196,8648051	13,0195956	3,3873247	93,1249003	33,65085
p150	61,8939104	6,1144548	2,040287	179,6198172	16,11688	1,0181567	48,3183884	16,2146752
p151	43,0548805	12,6532161	12,754159	200,3380174	45,7553642	2,7723121	76,7303173	68,3885718
p152	52,040506	6,2896972	9,4039368	184,0952666	14,6660448	2,3976374	41,40565	60,3560752
p153	58,2509483	9,3939421	8,8084396	216,196186	39,768772	2,0933844	34,1509271	26,414712
p154	50,4059036	6,5157314	3,8922281	172,6118107	31,0222702	1,0557412	30,9894907	15,5754408
p155	45,2510432	3,0043822	5,8188798	170,0782673	23,0325633	1,626487	14,9117639	33,81304
p156	45,0064934	6,2658578	12,6251866	169,6618092	30,1814842	1,0143743	30,6730294	79,9042909
p157	59,8755906	16,4555817	20,7715739	170,2830937	35,3086653	11,4990196	36,3154661	76,07285
p158	45,756388	5,7434968	12,2102368	189,1841695	32,6847545	5,8626625	30,0564032	79,6394829
p159	47,1598228	5,3453899	4,9471379	174,9703127	18,2781721	2,4383635	42,7030104	28,0784292
p160	42,6907483	9,5216938	11,3148122	161,2035078	17,2924589	4,7894561	41,7313877	33,8127776
p161	41,5845463	6,6397948	2,9079228	147,1488531	15,3429811	1,4383542	42,3753471	36,5442467
p162	39,7877027	5,0433293	4,3262482	167,3733513	20,3940031	2,4629969	24,1986362	18,2297812

Pasient nr	Plasma FAD	Plasma FMN	Plasma RF	Blod FAD	Blod FMN	Blod RF	Plasma PLP	Plasma 4-PA
p163	51,3464881	8,7096731	3,500503	159,6408779	18,4193022	2,0907188	26,8431267	19,6797587
p164	40,2619585	6,1698504	2,9125716	202,8885332	19,2937506	2,0636016	51,9570754	15,8091444
p165	51,6520611	10,5513833	7,9238347	158,6018731	15,3790201	2,8026806	41,2807127	29,1167717
p166	54,1838794	6,2625996	2,7816882	165,1827991	20,4468846	1,7185773	45,5394572	18,0019288
p167	46,2659269	9,3198987	2,4273752	160,2921655	17,3673742	1,5221995	44,1705113	26,1772998
p168	41,9027585	4,1855755	4,1916988	180,6083072	22,7294983	1,4642392	37,1037905	20,6078658
p169	50,4890408	11,3176835	3,0271336	179,6560921	10,3564532	1,1841581	55,7116638	30,1021033
p170	47,9960426	22,6038104	10,8767898	211,9769732	39,6458316	3,2135308	157,8495532	51,6137608
p171	57,7703067	4,9377108	2,6434776	189,6552048	19,6276886	1,2255293	51,4591541	21,344643
p172	49,9517144	3,2987286	2,1874815	187,8114382	17,1213051	1,4584557	21,3045194	14,1347229
p173	44,9348655	13,6526928	24,3818382	188,7052027	70,6420432	5,4560945	69,5292234	86,2289252
p174	43,8698094	5,2446431	3,7365692	200,1560105	22,9493185	1,2985624	36,5214309	33,2232274
p175	43,981348	8,4148182	18,2858811	198,2416412	21,9024031	6,5117142	29,2052843	24,0807509
p176	47,5678035	5,1907249	10,0530627	188,9012675	36,2325419	2,1185312	48,3318392	30,8376673
p177	51,5405186	12,1207112	22,1606638	233,1597409	38,132043	4,2470003	42,146231	38,5000292
p178	46,5523468	6,5469087	7,6070782	188,5150392	17,2980889	2,1033427	51,3730527	18,1891556
p179	45,7423279	2,5226718	2,7415811	195,6338041	15,929181	1,7366967	25,4202495	12,0785174
p180	48,0872821	4,4996384	6,0168513	170,0944951	18,846332	1,8062134	49,8985284	17,2197424
p181	53,6489245	4,8941613	5,9107581	191,7077513	36,6023378	1,7753292	36,101222	31,2634542
p182	43,512864	7,677223	15,3756495	161,8151234	21,1252542	4,6438009	48,7262161	29,8908611
p183	41,2707627	4,9989193	2,5986233	154,5960549	11,5005723	1,7885566	46,8170057	36,6785868
p184	48,4219356	9,2693605	5,2605968	205,0219516	22,874164	2,657716	57,3204186	15,7415878
p185	40,2773854	2,3694223	3,7719131	136,6039804	15,427829	2,1687379	16,1939131	29,9228772
p186	45,8808565	4,6737295	3,8376238	183,1840362	12,3753606	1,9585809	22,884607	23,4425515
p187	45,158812	4,6061252	4,7219732	198,8678645	30,3393675	1,7970985	34,8173238	21,720495
p188	38,8426889	9,7159938	4,3209329	158,661042	17,2479464	2,7867998	48,4860193	43,1683689
p189	50,4677156	3,6325028	1,7484646	162,3296286	9,5218354	1,2079401	31,3108965	15,7539462
p190	38,0749632	17,2921938	10,4548449	172,9655056	15,7981546	4,2754217	53,128913	15,7048945
p191	43,4072026	12,2331052	9,8921312	175,1126874	25,381725	4,5062446	63,9605247	31,7341294
p192	58,3569884	1,9770711	1,8906962	190,3748404	13,9692455	1,3743911	18,8563739	27,5438238
p193	43,8793902	23,9703255	41,7738933	209,9720841	54,4903459	12,9026453	138,2652723	149,0892882
p194	47,1219746	8,5895967	5,7606211	173,438546	28,029193	1,8079787	17,6024326	41,9068616
p195	43,4275513	8,5950067	16,251647	172,7400893	24,6456553	6,2824164	32,5081347	20,5638754
p196	53,3071652	13,1127605	9,312727	167,8423119	20,8036972	4,8684933	119,8952804	20,4645423
p197	55,8999319	7,2956225	3,2622907	185,7420612	17,0398136	1,8991918	39,3214588	43,6910556
p198	51,8914816	11,4562527	12,4622027	189,4595282	32,2142464	4,1281169	44,5319447	33,591392
p199	48,7140578	11,5683022	17,5766025	209,6121013	25,0983301	8,5912526	85,746346	74,5244954