

# **Effekt av havregrynsgrøt på tykktarmens bakterieflora**

- En eksplorativ studie av fekal beta-galaktosidase- og ureaseaktivitet i tykktarmen hos friske forsøkspersoner**

**Av**

**Nathalie Puaschitz**

**Mastergrad i human ernæring**



**Institutt for indremedisin**

**Det medisinske-odontologiske fakultet**

**Universitetet i Bergen**

**2009**

## **Takksigelser**

Jeg ønsker å takke flere personer som har hjulpet meg med at denne masteroppgaven er blitt realitet.

Spesielt ønsker jeg å takke veilederen Jørgen Valeur som alltid stilte opp når jeg hadde spørsmål, og som har hjulpet meg til med både den praktiske tilrettelegging og har gitt meg gode råd i skriveprosessen. Tusen takk for din innsats og velvilje, du er en utrolig flink veileder og har gitt meg bra inspirasjon hele veien.

Behzad Gharehnia som har hjulpet meg med å analysere prøvene mine og gitt meg opplæring i homogeniseringen og analysering av beta-galaktosidase og urease. Tusen takk for din innsats og tålmodigheten når jeg alltid hadde et spørsmål til.

Tove Berstad som har hjulpet meg med grovt homogeniseringen og urease analysen, og som har tatt seg tiden til å forklare meg begge deler.

Arnold Berstad som ga meg problemstilling til denne oppgaven.

Mette Morken, tusen takk for at du var min biveileder.

Forsøkspersoner som stilte opp for denne studien.

Familien min, Heliodor Rawski Verena Schwirrjohann, og ellers gode venner. Tusen takk for all støtte og oppmuntringer dere gir og har gitt meg.

Bergen, februar 2009

Nathalie Puaschitz

## Innholdsfortegnelse

Takksigelser.....	- 2 -
Innholdsfortegnelse.....	- 3 -
Sammendrag.....	- 5 -
1 Introduksjon.....	- 6 -
1.1 Bakgrunn.....	- 6 -
1.2 Tykktarmen (colon).....	- 6 -
1.2.1 Oppbygning.....	- 6 -
1.2.2 Bakterieflorens funksjoner .....	- 7 -
1.2.3 Tykktarmsbakterier.....	- 9 -
1.2.4 Gode eller dårlige bakterier? .....	- 11 -
1.2.5 Beta-galaktosidase.....	- 12 -
1.2.6 Urease .....	- 13 -
1.2.7 Probiotika.....	- 14 -
1.2.8 Prebiotika.....	- 15 -
1.3 Fiber .....	- 16 -
1.3.1 Definisjon .....	- 16 -
1.3.2 Struktur og inndeling .....	- 17 -
1.3.3 Havre og $\beta$ -glukan.....	- 18 -
1.3.4 Fordøyelse av fiber .....	- 19 -
1.3.5 Fermenteringsprosessen .....	- 20 -
1.4 IBS – en mikroflorasykdom? .....	- 21 -
1.5 Fibereffekt på IBS.....	- 23 -
1.6 Hensikten med oppgaven.....	- 23 -
2 Materiale og metoder.....	- 24 -
2.1 Deltakere .....	- 24 -
2.2 Etikk .....	- 24 -
2.3 Roma II skjema.....	- 25 -
2.4 Havregrøt.....	- 25 -

2.5	Innsamling av fecesprøver .....	- 25 -
2.6	Analyse-beskrivelser .....	- 26 -
2.6.1	Homogenisering.....	- 26 -
2.6.2	Beta-galaktosidase enzymanalyse .....	- 27 -
2.6.3	Urease enzymanalyse modifisert etter Worthington.....	- 32 -
2.6.4	Urease analyse etter ”rapid urease test” .....	- 35 -
2.7	Statistikk.....	- 36 -
3	Resultater.....	- 38 -
3.1	Demografi .....	- 38 -
3.2	Fecesvekt .....	- 38 -
3.3	Beta-galaktosidase aktivitet.....	- 38 -
3.4	Urease aktivitet.....	- 39 -
3.5	Korrelasjon mellom beta-galaktosidase og urease aktivitet .....	- 41 -
3.6	Korrelasjon mellom Worthington urease analyse og ”rapid-urease-test” .....	- 41 -
3.7	Korrelasjon mellom fecesvekt og enzymaktiviteter .....	- 42 -
4	Diskusjon.....	- 44 -
4.1	Fekal beta-galaktosidaseaktivitet .....	- 44 -
4.2	Fecal ureaseaktivitet.....	- 45 -
4.3	Korrelasjon mellom de to ureaseanalysene .....	- 46 -
4.4	Svakheter ved metodene.....	- 46 -
4.4.1	Forhold ved forsøkspersonene og forsøksdesignet:.....	- 46 -
4.4.2	Forhold ved bearbeiding og analysene av fecesprøvene: .....	- 47 -
4.5	Konklusjon .....	- 48 -
5	Referanser.....	- 50 -
6	Vedlegg .....	- 54 -

## **Sammendrag**

Irritabel tarm (IBS) er en kronisk lidelse som rammer ca. 15 prosent av befolkningen, og kjennetegnes ved magesmerter, oppblåsthet/gassplager og avføringsforstyrrelser. Det er mye som tyder på at bakteriefloraen til pasienter med IBS er i ubalanse, og dette kan kanskje delvis forklare mage-tarmplagene hos disse pasientene. Havregrøt kan erfaringsmessig bedre symptomene ved IBS, men virkningsmekanismen er ukjent.

Hensikten med denne masteroppgaven var å samle inn fecesprøver fra friske forsøkspersoner før og etter inntak av havregrøt, for å teste hypotesen om at havregrynsgrøt er et prebiotikum som stimulerer vekst av gode bakterier som produserer enzymet beta-galaktosidase, og hemmer vekst av dårlige bakterier som produserer enzymet urease. Disse enzymene kan måles i feces.

I studien inngikk 10 friske forsøkspersoner. Alle besvarte et spørreskjema, basert på Roma II kriteriene for å utelukke IBS. Forsøkspersonene spiste havregrøt en gang om dagen i en uke og samlet avføringsprøver i 3 døgn før og etter. Avføringsprøvene ble fryst ned umiddelbart. I disse prøvene ble det målt beta-galaktosidase- og ureaseaktivitet.

Både beta-galaktosidaseaktiviteten og ureaseaktiviteten målt ved hjelp av ”rapid-urease test” falt signifikant etter behandling med havregrøt. Fekal ureaseaktivitet målt ved hjelp av modifisert Worthington-metode endret seg derimot ikke. Det var ingen signifikante korrelasjoner mellom noen av analysene, verken før eller etter behandling med havregrøt. Fecesvekten endret seg ikke, og hadde liten betydning for enzymaktiviteten.

Studien viser at 1 ukes behandling med havregrøt kan endre funksjonen til tykktarmens bakterieflora. Dette kan tyde på at havregrøt er et prebiotikum som bør undersøkes nærmere i fremtidige studier.

## 1 Introduksjon

### 1.1 Bakgrunn

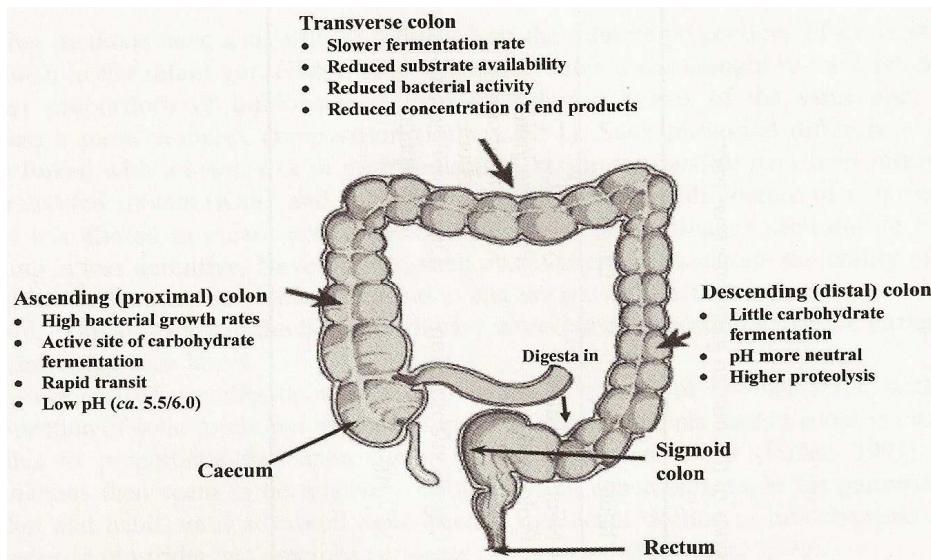
Alle organismer lever i kontinuerlig interaksjon med omgivelsene sine. Dette samspillet er en forutsetning for liv, men kan også være livstruende. I den humane fordøyelsestrakten hos voksne finnes det omlag  $10^{14}$  mikroorganismer fordelt på minst 1000 forskjellige arter (Kässinen, Krogus-Kurikka et al. 2007). Tarmfloraen utgjøres hovedsakelig av bakterier, men også virus, sopp og protozoer kan finnes. Per i dag kan vi kun dyrke 20 % av bakterieartene i tarmen. Grunnen til dette er at vi ennå ikke har nok forståelse for vekstforholdene til de resterende 80 %, og/eller fordi det er krevende å gjenskape forholdene (Pimentel 2006). Mikrofloraen kan derfor anses som et eget organ i kroppen vår, som i størrelse og metabolsk aktivitet sammenlignes med leveren (Bazzocchi, Gionchetti et al. 2002). Humane studier har vist at det er mulig å påvirke tykktarmens bakterieflora ved hjelp av matvarer, som på en gunstig måte forandrer sammensetningen av denne. Slike næringsmidler kalles gjerne prebiotika (de Vrese and Schrezenmeir 2008).

Introduksjonsdelen til denne oppgaven gir en oversikt om tykktarmens struktur og funksjon, og over sammensetning og betydning av tykktarmsbakteriene. I tillegg gis en forklaring på hvorfor havre kan betraktes som potensielt prebiotikum og eventuelt forbedre vår tykktarmsflora, ved å øke antallet gode bakterier som produserer beta-galaktosidase, og minke antallet dårlige bakterier som produserer urease. Til slutt diskuteres en mulig sammenheng mellom bakteriefloraen og irritabel tarm (IBS), og hvordan behandling med havregrot kan tenkes å bedre symptomene ved IBS.

### 1.2 Tykktarmen (colon)

#### 1.2.1 Oppbygning

Tykktarmen (colon) fortsetter rett etter tynntarmen, og deles inn i seks forskjellige deler. Den starter med cøcum (blindtarmen), fortsetter med colon ascendens (oppadstigende tykktarm), colon transversum (tverrgående tykktarm), colon descendens (nedadgående tykktarm), sigmoideum (etter den romerske bokstaven "S"), og slutter med endetarmen (rektum) (fig. 1.1) (Vernazza, Rabiou et al. 2006).

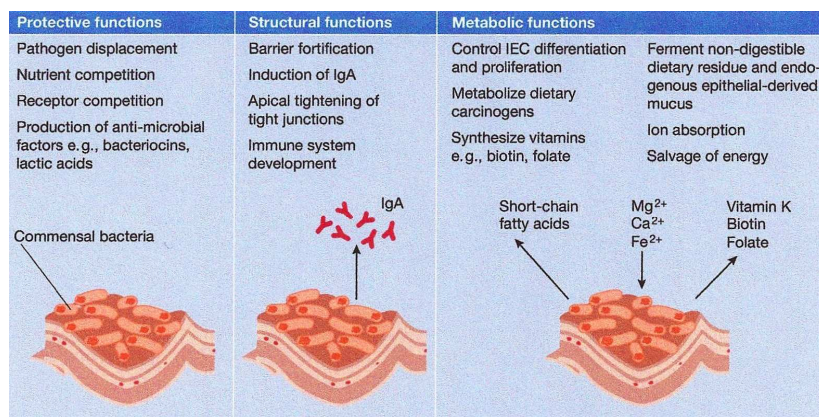


**Figur 1.1** Inndeling av tykktarmen, basert på regionale forskjeller i fysiologi og mikrobiologi (Vernazza, Rabiou et al. 2006)

Generelt kan man si at pH verdiene i colon er relativt nøytrale, men det er likevel klare regionale forskjeller. I proksimale colon er pH lav (ned mot 5,5), sannsynligvis på grunn av uttalt sakkarytisk (karbohydratnedbrytning) aktivitet med produksjon av små, organiske syrer (Vernazza, Rabiou et al. 2006). Det foregår mindre sakkarytisk i distale colon, og pH verdiene er derfor høyere her. Proteolytiske (proteinnedbrytende) enzymer fungerer best ved nøytrale pH-verdier (Blachier, Mariotti et al. 2007), og dette er sannsynligvis grunnen til at det er størst proteolytisk aktivitet i distale deler av tykktarmen.

### 1.2.2 Bakterieflorens funksjoner

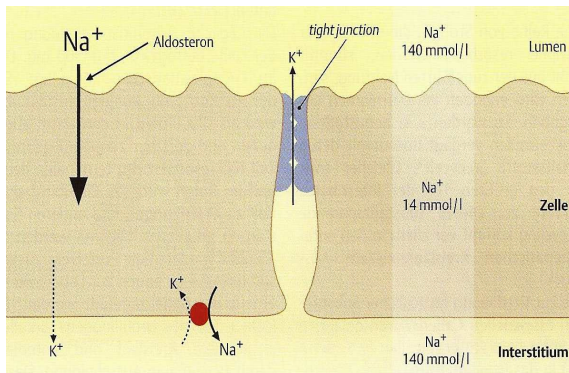
Den bakterielle tykktarmsfloraen har tre hovedfunksjoner: (1) En strukturell (2) en beskyttende og (3) en metabolsk (fig. 1.2) (O'Hara and Shanahan 2006).



**Figur 1.2** Bakterieflorens beskyttende, strukturelle og metabolske funksjoner (O'Hara and Shanahan 2006).

## 1) Strukturell funksjon

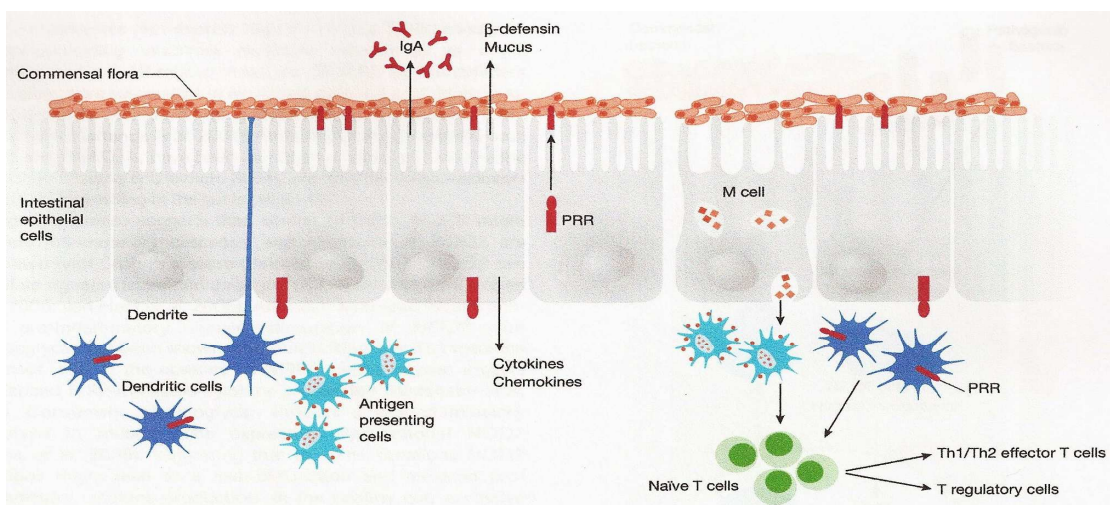
Den mest kjente colonfunksjonen er reduksjon av vanninnholdet i avføringen, slik at ca. 1-1,5 L vann absorberes hvert døgn (fig.1.3) (Biesalski and Grimm 2002). Dette skjer gjennom apikale innsnevninger (tight junctions) i epitelcellen som forhindrer at



Na<sup>+</sup> og vann kan strømme tilbake i tarmlumen. Den drivende kraft for dette er Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpen (Biesalski and Grimm 2002).

**Figur 1.3** Skjematisk fremstilling av vannabsorpsjonen fra tarmlumen til interstitium (Biesalski and Grimm 2002).

Bakteriefloraen stor betydning for opprettholdelse av tarmens barrierefunksjon mot uønskete inntrengere og utviklingen av immunsystemet vårt etter fødselen (Guarner and Malagelada 2003). Bakteriefloraen stimulerer immunsystemet slik at det opprettholdes en balanse i forholdet mellom mikroorganismer og vert, og sørger også for opprettholdelse av den orale toleranse, slik at vi tåler en viss mengde patogener, via matvarer, uten å bli syke. Dette skjer ved at tarmens mikroflora stimulerer tarmepitelet til produksjon og utskillelse av ulike signalmolekyler, som immunglobulin A (IgA) og forskjellige kjemokiner (fig.1.4). Disse stoffene påvirker blant annet modningen av ulike typer immunceller og styrer dermed immunresponsen vår (O'Hara and Shanahan 2006).



**Figur 1.4** Mekanismer for hvordan tarmbakterier kan påvirke modning av immunsystemet vårt (O'Hara and Shanahan 2006).



## 2) Beskyttende funksjon

Tilstedeværelsen av den normale tarmfloraen hindrer i stor grad at patogene bakterier kan etablere seg. Man kan kanskje si at tarmfloraen vår fører krig mot konkurrerende mikrober og at utskillelse av ulike typer baktericider og melkesyre er dens våpen (O'Hara and Shanahan 2006). Sikkert er det hvertfall at en intakt bakterieflora beskytter oss mot forskjellige tarminfeksjoner – best kjent er nok clostridium difficile-kolitten (Guarner and Malagelada 2003).

## 3) Metabolsk funksjon

Den metabolske, bakterielle colonfunksjonen ligger i nedbrytning og fermentering av tungt fordøyelige næringsstoffer, først og fremst komplekse karbohydrater. Dette inkluderer fiber, resistent stivelse og proteiner som ikke ble hydrolysert eller absorbert i øvre delen av fordøyelsestrakten (Valeur and Berstad 2008). Denne nedbrytningsprosessen fører blant annet til produksjon av kortkjedede fettsyrer, som absorberes av tykktarmsslimhinnen og tilfører oss ca. 2-10 % av det daglige energibehovet vårt (Biesalski 2000). Det er holdepunkter for at produksjonen av kortkjedede fettsyrer, som acetat og propionat kan påvirke glukose metabolisme, ved at absorpsjonen av disse nedsetter matens glykemiske indeks. Dette kan gi forbedret insulinsensivitet (Guarner and Malagelada 2003). I tillegg syntetiserer bakteriene vitamin K, biotin og folat. Absorpsjon av magnesium, kalsium, og jern forbedres via bakteriefloraens karbohydratfermentering og produksjon av korte fettsyrer (Guarner and Malagelada 2003).

### **1.2.3 Tykktarmsbakterier**

Den nær nøytrale pH-verdien gir gunstige forhold for bakteriekolonisering og danner grunnlag for en kompleks og relativ stabil colonflora (Vernazza, Rabiou et al. 2006). I motsetning til tynntarmen med  $\sim 10^6$  og ventrikkelen med  $\sim 10^3$ , ligger det totale antallet bakterier i colon ved  $\sim 10^{14}$  (He, Venema et al. 2008). Disse utgjør omtrent halvparten av den totale fecesvekten (Biesalski 2000). De lave bakterietallene i ventrikkelen og tynntarmen skyldes først og fremst at magesaft, galle og bukspytt har bakteriedrepende og/eller -hemmende egenskaper (Holzapfel, Haberer et al. 1998). I tillegg begunstiges bakteriekoloniseringen i colon av en nærmest konstant leveranse av næring og en langsom colontransittid (ca. 48-70 timer) (Vernazza, Rabiou et al. 2006). Dette i motsetning til øvre tarmkanal, som "rengjøres" mekanisk mellom

måltidene, ved såkalt fastemotorikk (migrerende myoelektriske komplekser (MMC) kalles av denne grunn for tynntarmens hushjelp”.

Sammensetningen av colonfloraen er individuell. Hver enkelt av oss har vårt eget ”fingeravtrykk” av typer og antall bakterier (Pimentel 2006). Grunnlaget for dette ”fingeravtrykket” etableres allerede ved fødselen (O'Hara and Shanahan 2006). De første bakterier vi får i oss fra omgivelsene modulerer genekspresjonen i vertens epitelceller og lager derved et miljø som er tilpasset for nettopp dem. I tillegg hindrer de vekst av andre bakterier (Holzapfel, Haberer et al. 1998). De første bakteriene vi kommer i kontakt med, opptar med andre ord unike, såkalte økologiske nisjer, som gjør det vanskeligere for konkurrerende bakterier å etablere seg. Etter fødselen blir den sterile fordøyelsestrakten først kolonisert med *Escherichia coli* og *Streptococci*, og innen de første 24 timer også med *Lactobacilli* (Vernazza, Rabiou et al. 2006). Etter 48 timer finnes det også andre coliforme bakterier og enterococci. *Bacteroides* finnes først etter 72 timer (Vernazza, Rabiou et al. 2006). Sistnevnte reduserer redokspotensialet i colon, slik at andre bakterier, eksempelvis *Bifidobacterium*, *Clostridia*, *Enterobakterier*, *Enterococcus faecalis*, og *Eubacterium*, kan kolonisere tarmlumen (Vernazza, Rabiou et al. 2006). ). En oversikt over de mest kjente colonbakterier er vist i tabell 1.1.

Bacteria	Description	Numbers reported in faeces (log <sub>10</sub> per g dry wt)		Nutrition	Fermentation products <sup>a</sup>
		Mean	Range		
<i>Bacteroides</i>	Gram -ve rods	11.3	9.2–13.5	Saccharolytic	A, P, S
<i>Eubacteria</i>	Gram +ve rods	10.7	5.0–13.3	Saccharolytic, some amino acid fermenters	A, B, L
<i>Bifidobacteria</i>	Gram +ve rods	10.2	4.9–13.4	Saccharolytic	A, L, f, e
<i>Clostridia</i>	Gram +ve rods	9.8	3.3–13.1	Saccharolytic, some amino acid fermenters	A, P, B, L, e
<i>Lactobacilli</i>	Gram +ve rods	9.6	3.6–12.5	Saccharolytic	L
<i>Fusobacteria</i>	Gram -ve rods	8.4	5.1–11.0	Amino acid fermenters, carbohydrate assimilated	B, A, L
<i>Ruminococci</i>	Gram +ve cocci	10.2	4.6–12.8	Saccharolytic	A
<i>Peptostreptococci</i>	Gram +ve cocci	10.1	3.8–12.6	Saccharolytic, some amino acid fermenters	A, L
<i>Peptococci</i>	Gram +ve cocci	10.0	5.1–12.9	Amino acid fermenters	A, B, L
<i>Propionibacteria</i>	Gram +ve rods	9.4	4.3–12.0	Saccharolytic, lactate fermenters	A, P
<i>Actinomyces</i>	Gram +ve rods	9.2	5.7–11.1	Saccharolytic	A, L, S
<i>Streptococci</i>	Gram +ve cocci	8.9	3.9–12.9	Carbohydrate and amino acid fermentation	L, A
<i>Escherichia</i>	Gram -ve rods	8.6	3.9–12.3	Carbohydrate and amino acid fermentation	Mixed acid
<i>Desulfovibrios</i>	Gram -ve rods	8.4	5.2–10.9	Various (e.g. SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> )	A
<i>Methanobrevibacter</i>	Gram +ve cocci bacilli	8.8	7.0–10.5	Chemolithotrophic	CH <sub>4</sub>

<sup>a</sup>A, acetate; P, propionate; B, butyrate; L, lactate; S, succinate; f, formate; e, ethanol. +ve, positive; -ve, negative.

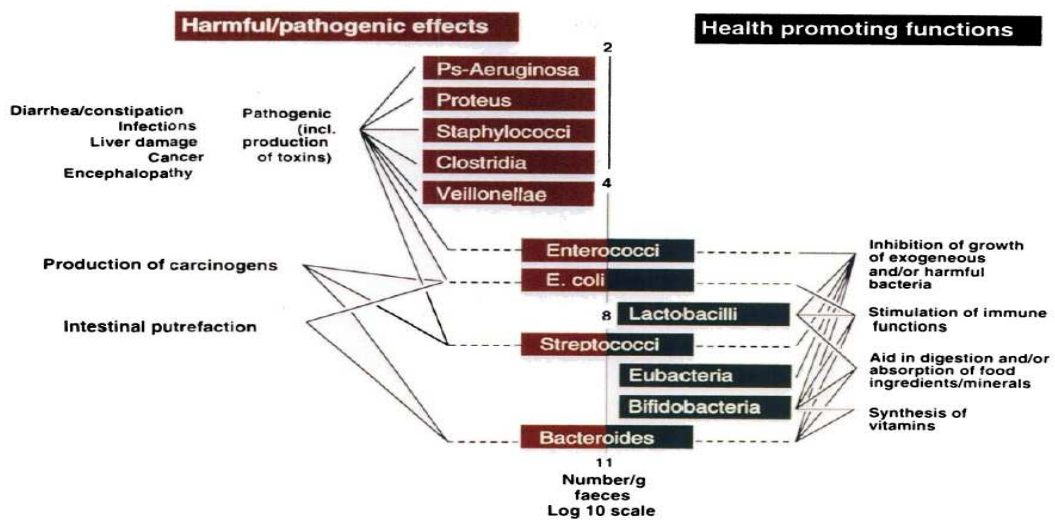
**Tabell 1.1** Oversikt over de viktigste bakteriene som finnes i human feces (Salminen et al., 1998).

Sammensetning av bakteriefloraen er forskjellig hos barn som blir ammet og barn som får ”flaskemat” (Vernazza, Rabiou et al. 2006). Barn som ammes har høyere antall bifidobakterier, og dette har blitt satt i sammenheng med en lavere risiko for utvikling av gastrointestinale, respiratoriske og urologiske infeksjoner. Fram til

avvenning dominerer Lactobacilli, men etter introduksjonen av fast føde og ved ca. 2 år etter fødselen, begynner barn å bygge opp en mikroflora som likner den voksne (Vernazza, Rabiou et al. 2006). Det betyr at antall bifidobakterier går ned, til fordel for gram negative bakterier, og slik forblir det mer eller mindre konstant gjennom hele livet vårt. Den primære koloniseringen av bakterier er altså i stor grad avgjørende for den permanente bakteriefloraen i voksen alder (Guarner and Malagelada 2003).

Ved diaré, antibiotikabruk, eller omlegging av kosten kan bakteriefloraen påvirkes og forandres (Guarner and Malagelada 2003). Men selv om den i perioder kan variere, vil den likevel over tid være nokså konstant (Pimentel 2006). Vi lever altså i en forholdsvis stabil symbiose med våre tarmbakterier (Bjarnason and Bjarnason 2005).

#### 1.2.4 Gode eller dårlige bakterier?



**Figur 1.3** Inndeling av colonbakterier i "gode" og "dårlige". Figuren viser dessuten omtrentlig antall av de viktigste bakteriestammene i tykktarmen (Gibson and Roberfroid 1995).

Den utbredte inndelingen i gode og dårlige colonbakterier (fig.1.5) er egentlig tvilsom sett fra et vitenskapelig perspektiv (Pimentel 2006). De fleste tarmbakteriene forårsaker for eksempel mye skade hvis de slipper over i blodbanen, og har nok ingen overordnede intensjoner eller hensikter av moralsk karakter, annet enn å sørge for sin egen overlevelse og reproduksjon. Inndelingen er kanskje likevel

berettiget utfra didaktiske hensyn, når vi betrakter visse helsemessige aspekter ved den luminale bakteriefloraen og dens produkter (Pimentel 2006).

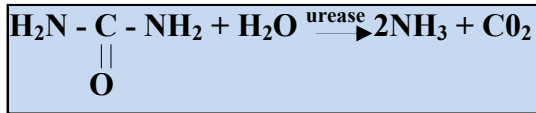
Til den gode gruppen regnes typisk de melkesyreproduserende bakteriene som Lactobacilli og Bifidobacteria (Vernazza, Rabiou et al. 2006). Ikke minst i matvareindustrien er det et overordnet mål å øke andelen av disse bakteriene i tarmen ved utviklingen av såkalte funksjonelle matvarer (Pimentel 2006). Man mener at dette har viktige konsekvenser for helsen, blant annet ved å motvirke infeksjoner, stimulere immunforsvaret og assistere assimilasjon av næring (de Vrese and Schrezenmeir 2008).

De såkalt dårlige tarmbakteriene, som clostridia, staphylococcus aureus, E.coli og streptococcus, har negative helseeffekter (Vernazza, Rabiou et al. 2006). De kan forårsake infeksjoner og produsere toksiske nedbryningsprodukter ("forråtnelse"), som blant annet har vært forslått å stå sentralt i utviklingen av både kreft og betennelsestilstander i tarmen (Vernazza, Rabiou et al. 2006). I tillegg til slike direkte patogene effekter, kan et økt antall dårlige bakterier tenkes å fortrenge de gode bakteriene, ved å produsere antimikrobielle substanser, såkalte baktericider, som hemmer vekst av de gode bakteriene (Guarner and Malagelada 2003).

### **1.2.5 Beta-galaktosidase**

Beta-galaktosidase kalles gjerne for mikrobiell laktase, fordi dette enzymet har samme katalytiske aktivitet som human beta-galaktosidase (= laktase) (Casci and Rastall 2006). Dette enzymet brukes gjerne som makør for en "sunn" bakterieflora, og er et enzym som blant annet produseres av de gode bifidobakteriene i colon. Disse er de vanligste bakteriene i colon, og har trolig en rekke positive effekter på helsa vår (Vernazza, Rabiou et al. 2006). En bakterieflora med stor beta-galaktosidase produksjon ser dessuten ut til å beskytte mot laktoseintoleranse-symptomer ved laktosemalabsorpsjon, kanskje fordi den mikrobielle laktaseaktiviteten kan kompensere for vertens manglende, humane laktaseaktivitet (R. Jarlsby, J. Valeur et al. 2008). Beta-galaktosidase skilles ut med avføringen, og det finnes analysemetoder for å måle enzymets aktivitet i feces.

### 1.2.6 Urease



**Fig.1.6** Den urealytiske reaksjon; med urease som kataysator, og ammoniakk som produkt.

Urease er et enzym som produseres av en lang rekke ulike bakterier som koloniserer både urinveiene og tarmene (Burne and Chen 2000). En av disse bakteriene er *Helicobacter pylori* som kan finnes i magesekken (Moblely, Island et al. 1995). Erkjennelsen av at *H. pylori* kan forårsake magesår vakte i sin tid stor oppsikt, fordi magesår den gang ble ansett for å være en prototypisk psykosomatisk sykdom. Arbeidet til oppdagerne, Marshall og Warren, ble belønnet med Nobelprisen i fysiologi eller medisin i 2005.

Urease katalyserer reaksjonen mellom urea og vann, og bryter disse ned til karbondioksid og ammoniakk (fig.1.6) (Olivera-Severo, Wassermann et al. 2006). Ammoniakk er et velkjent giftstoff, og kan blant annet være hovedgrunnen til den hjernesykdommen (hepatisk encephalopati) som kan utvikles når leveren ikke lenger greier å rense blodet for ammoniakk (Ytrebø 2007). I tillegg sørger ammoniakk for alkalisering av pH-verdien, og høy pH gir gode vekstvilkår for dårlige bakterier. Dette gjør det mulig for *H. pylori* å eksistere i magesekkenes sure miljø (Collins and D'Orazio 1993). *Proteus mirabilis* er en annen ureaseproduserende bakterie som kan kolonisere urinveiene og gi urinveisinfeksjoner. Denne bakterien øker også produksjonen av ammoniakk, slik at urinen blir basisk, blant annet med fare for dannelse av urinstener (Burne and Chen 2000). Dette skaper her, likesom i magesekken, et bra miljø for vekst av patogene bakterier. I tykktarmen kan det finnes en lang rekke andre ureaseproduserende bakterier, som *Ureaplasma urealyticum*, *Proteus mirabilis*, peptostreptokokker og *Klebsiella* (Burne and Chen 2000).

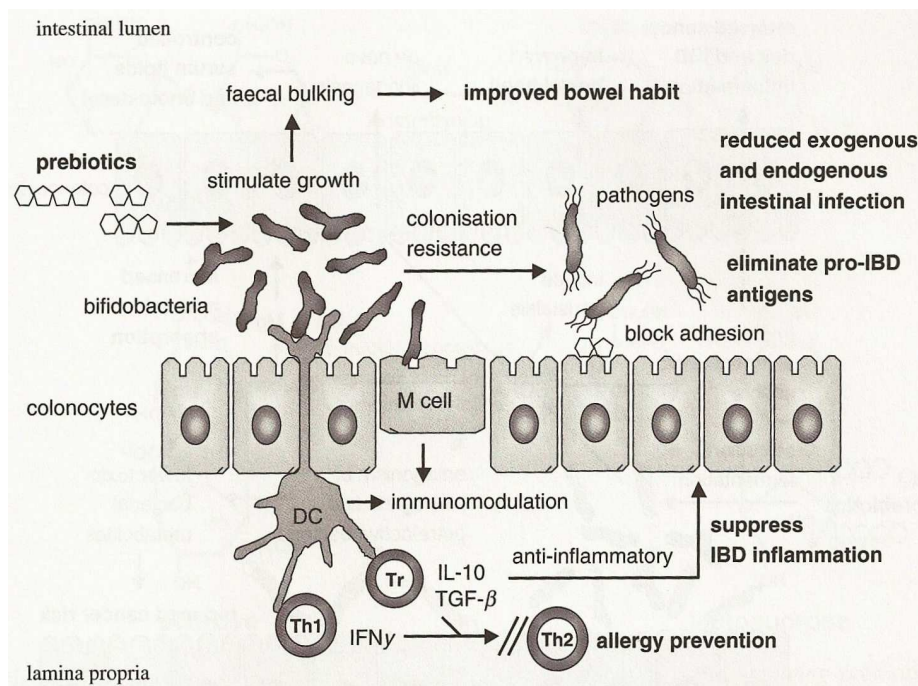
Det synes å være en generell oppfatning at ureaseproduserende bakteriene har en negativ virkning på helsa vår, og det antas at økt antall ureaseproduserende bakterier i tykktarmen forstyrrer bakteriefloraen vår ved å fortrenge antall gode bakterier (Burne and Chen 2000). Urease kan måles i avføringen ved hjelp av forskjellige analyse metoder.

### 1.2.7 Probiotika

Bakteriefloraen kan komme i ubalanse på grunn av en rekke forhold, mest kjent er kanskje forstyrrelser etter antibiotikabruk (Pimentel 2006). Ved slike forstyrrelser kan det være ønskelig å øke antallet av gode colonbakterier ved å tilføre dem til kroppen i form av probiotika. Et probiotikum kan defineres som et visst antall levende bakterier tilsatt en matvare, som ved tilførsel til tarmen er til fordel for vertens helse (Vernazza, Rabiou et al. 2006). Disse skal altså ha en positiv effekt på helsen vår, først og fremst ved å bekjempe såkalte dårlige bakterier (Pimentel 2006). Melkesyrebakterier er anerkjente probiotiske bakterier, og mest utbredt er bruk av *Lactobacillus acidophilus* og *Bifidobacterium bifidum* (de Vrese and Schrezenmeier 2008).

Det blir diskutert om inntaket av probiotika kun er av kommersiell interesse eller om kolonfloraen virkelig kan påvirkes og langvarig forbedres av dette. Intuitivt kan det synes naivt å tro at man skal kunne klare å forandre et så vidt komplekst økosystem, med mer enn 1000 forskjellige arter, ved bare å tilføre et par utvalgte bakterietyper (Pimentel 2006). Det er heller ikke endelig avklart at all bruk av probiotika kun har positive effekter. Det er vist at probiotikatilførsel kan være farlig, særlig for kritisk syke, som pasienter med akutt alvorlig pankreatitt (Besselink, van Santvoort et al. 2008). Videre har man funnet ut at probiotika kan være resistente mot antibiotika, og det kan tenkes at denne resistensen kan overføres til andre, mer skadelige bakterier (Vernazza, Rabiou et al. 2006). Probiotika er også i søkelyset som mulig årsak til overvekt: Selv om dette langt fra er kartlagt, er det grunn til å minne om at de vanligste probiotiske bakteriene faktisk tilhører Firmicutes-slekten, som er fedmeassosiert (Ley, Turnbaugh et al. 2006).

## 1.2.8 Prebiotika



**Figur 1.7** Helsefremmende mekanismer ved prebiotika inntak (Rastall 2006).

En annen mulighet å påvirke bakteriefloraen på er ved bruk av prebiotika. Prebiotika defineres som ikke fordøyelige, men fermenterbare næringsmidler som frembringer helsefremmende endringer i tarmens bakterieflora (fig.1.7) (de Vrese and Marteau 2007). Karakteristisk for prebiotika er motstandsdyktigheten overfor de menneskelige fordøyelsesenzymene, evnen til å bli fermentert (gjæret) i colon og den pH-senkende effekten i tarmlumen ved fermentering (de Vrese and Marteau 2007). Prebiotika stimulerer vekst og/eller aktivitet av et begrenset antall av bakterier i colon (Gibson and Roberfroid 1995), og dette skal føre til en forandring i den totale mikrobielle balansen i colon, og forbedre helsa vår (Gibson and Roberfroid 1995). I dag oppfyller kun ikke-fordøyelige oligosakkarider, og delvis også inulin, kriteriene for prebiotika (de Vrese and Schrezenmeir 2008), men det finnes flere andre mulige prebiotika kilder som bør undersøkes. In vitro studier har vist at 4 gram oligofruktose per dag kan øke antallet bifidobakterier og redusere antallet coliforme bakterier og gram positive kokker (Rao 1999). Indirekte kan en slik endret bakterieflora ha en rekke potensielt helsefremmende effekter, men vi har fortsatt begrenset kunnskap om dette (de Vrese and Schrezenmeir 2008). Foreslåtte effekter inkluderer forebygging av diaré, forstoppelse og kreft, positive effekter på lipidmetabolismen, og stimulering av mineralabsorpsjonen (de Vrese and Schrezenmeir 2008). Prebiotika kan inntas

sammen med probiotika, og slike produkter kalles symbiotika (Vernazza, Rabiou et al. 2006).

Class of oligosaccharide	Molecular structure <sup>a</sup> (Sako <i>et al.</i> , 1999)	Physiological features (Sako <i>et al.</i> , 1999)	Major manufacturers	Trade names
1 Fructooligosaccharides/ Inulin	(Fr) <sub>n</sub> -Gu	β-1,2	Meiji Seika Kaisha (Japan) Beghin-Meiji Industries (France) Orafti (Belgium)	Meiologo Actilight Raftilose
2 Galactooligosaccharides	(Ga) <sub>n</sub> -Gu	β-1,4, β-1,6	Yakult Honsha (Japan) Nissin Sugar Manufacturing Company (Japan)	Oligomate Cup-Oligo
3 Isomaltooligosaccharides	(Gu) <sub>n</sub>	α-1,6	Showa Sangyo (Japan)	Isomalto-900
4 Lactulose	Ga-Fr	β-1,4	Morinaga Milk Industry Co. (Japan) Solvay (Germany)	MLS/P/C
5 Soybean oligosaccharides	(Ga) <sub>n</sub> -Gu-Fr	α-1,6	The Calpis Food Industry Co. (Japan)	Soya-oligo
6 Lactosucrose	Ga-Gu-Fr	β-1,4	Ensuiko Sugar Refining Co. (Japan)	Nyuka-Origo
7 Xylooligosaccharides	(Xy) <sub>n</sub>	β-1,4	Suntory Ltd (Japan)	Xylo-oligo
8 Gentiooligosaccharides	(Gu) <sub>n</sub>	β-1,6	Nihon Shokuhin Kako (Japan)	Gentose

<sup>a</sup>Ga, galactose; Gu, glucose; Fr, fructose; Xy, xylose.

**Tabell 1.2** Oversikt over noen mulige prebiotika preparater og deres sammensetning (Casci and Rastall 2006).

## 1.3 Fiber

Vannløselige fibre er alle potensielle prebiotika, fordi disse stoffene ikke brytes ned i tyntarmen, men lett fermenteres av bakteriefloraen i colon (Vernazza, Rabiou et al. 2006). Dette kan tenkes å gi optimalt miljø for produksjon av *Lactobacillus* og *Bifidobacterium*, selv om dette bare er vist for et begrenset antall preparater (Bullock and Jones 2006).

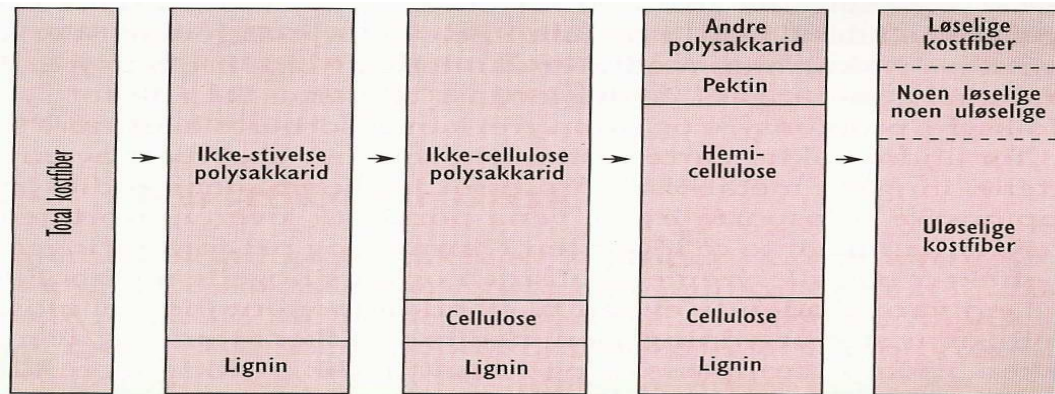
### 1.3.1 Definisjon

Fiber er matvarer som ikke, eller bare delvis, kan brytes ned av duodenum- eller pankreasenzymer, og derfor transporteres videre til tykktarmen i stort sett uendret tilstand (Biesalski 2000). Mennesker mangler enzymer for å bryte ned blant annet β-1-4-glykosidiske bindinger som finnes i cellulose og β-glukan (Lupton and Trumbo 2006). Kjemisk sett består fiber av polysakkarider (komplekse karbohydrater) (Bunzel and Steinhart 2003). Unntaket er lignin som er polyfenylpropan (Huth and Büdingen 2004).



### 1.3.2 Struktur og inndeling

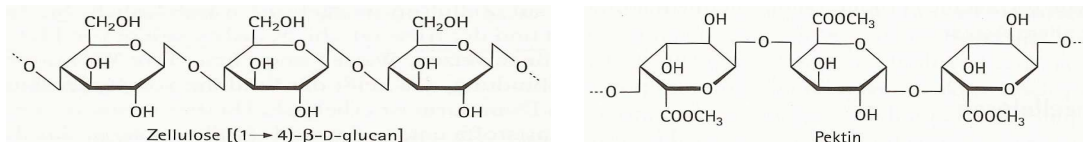
Kostfiber eller ufordøyelige komplekse karbohydrater (polymerer) består av lange kjeder av ulike monosakkarider (monomerer), som glukose, fruktose, arabinose, ribose og deres derivater (Biesalski and Grimm 2002), som er linket til hverandre med forskjellige glykosidiske bindinger (Scheck 2002).



**Figur 1.8** Inndeling av kostfiber (Bjørneboe and Aarsland 2005).

Fiber kan inndeles etter løselighetsgrad i vann (fig.1.8) (Bunzel and Steinhart 2003). De uløselige fiberstoffer, som *cellulose* (fig.1.9) og de fleste former av *hemicellulose*, er lite vannløselige. *Lignin* har ingen vannløsningssevne (Bunzel and Steinhart 2003). Disse fiberstoffene, som også kalles for strukturfiber, blir nesten ikke fermentert i tykktarmen og har en høy vannbindingskapasitet som bevares pga. den nedsatte fermenteringsprosessen (Biesalski 2004). De sørger derfor for økt tarmmotilitet og øker fecesvolumet (Huth and Büdingen 2004).

Løselige fiberstoffer har en lav vannbindingskapasitet, men reagerer med vann og danner en geléaktig masse ("gel"), og kalles derfor geldannende fiberstoffer (Biesalski 2000). De kan kun nedbrytes ved hjelp av colonbakteriens enzymer. De viktigste av dem er *pektin* (fig.1.9), *metylcellulose*, *guargummer*, *pektin*, *alginat* og *noen hemicellulose typer*, som *β-glukan* (Biesalski 2000). Vannløselige fibre kan fungere som prebiotika, fordi disse stoffene ikke brytes ned i tynntarmen, men lett fermenteres av bakteriefloraen i colon (Vernazza, Rabiou et al. 2006) Spesielt beta-glukan synes å gi optimalt miljø for vekst av *Lactobacillus* og *Bifidobacterium* (Bullock and Jones 2006).



**Figur 1.9** Cellulosestruktur (venstre), og pektinstruktur (høyre) (Huth and Büdingen 2004).

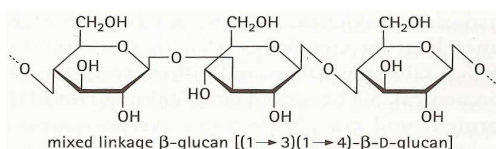
### 1.3.3 Havre og β-glukan



**Figur 1.10** Havrekorn ([http://z.hubpages.com/u/119399\\_f520](http://z.hubpages.com/u/119399_f520)).

Beta-glukan er hovedkomponenten i de fleste kornsorter, men finnes mest i havre (fig.1.10) og bygg (Huth and Büdingen 2004). Produksjonen av β-glukaner skjer i kornets endosperm, som videre distribuerer dem til sine cellvegger, som består av 75% β-glukaner (Sadiq Butt, Tahir-Nadeem et al. 2008). Beta-glukanene i havre har, i forhold til bygg og andre kornsorter, en høyere vannbindingskapasitet (Huth and Büdingen 2004) og dermed en særlig høy viskositet selv ved relativ lave konsentrasjoner (Sadiq Butt, Tahir-Nadeem et al. 2008).

Beta-glukaner består av uforgreinet polysakkarider som er bygget opp av glukosemolekyler og likner på cellulose, men består i tillegg til β-1-4-glykosid-bindinger (30 %) også av β-1-3-glykosid-bindinger (70 %) (fig.1.11) (Huth and Büdingen 2004). På grunn av dette brukes også navnet ”mixed-linked β-glucan” (Huth and Büdingen 2004).



**Figur 1.11** β-glukan struktur (Huth and Büdingen 2004).

De mindre løselige og uløselige fiberstoffene finnes i havrefrøets ytre skall og kalles kli (= bran) (Sadiq Butt, Tahir-Nadeem et al. 2008). Kli består hovedsakelig av cellulose, hemicellulose og lignin, men også av B-vitaminer, proteiner, fett, mineraler og en liten andel β-glukaner (Sadiq Butt, Tahir-Nadeem et al. 2008). Havrekli får vi i oss blant annet når vi spiser havregryn. Havre er altså en god kilde til både vannløselige og vannløselige fiberstoffer (Sadiq Butt, Tahir-Nadeem et al. 2008).

Kjente positive effekter av  $\beta$ -glukan i kostholdet inkluderer senkning av LDL-kolesterol og apo-lipoprotein, trolig på grunn av økt utskillelse av gallesyrer som er laget av kolesterol (Sadiq Butt, Tahir-Nadeem et al. 2008). Videre fører inntak av beta-glukan til en utflating av postprandiale glukosetopper ved glukosebelastning, og dette har praktisk betydning ved diabetes mellitus (Huth and Büdingen 2004). Beta-glukan kan ha anti-inflammatoriske effekter ved å forebygge både bakterie- og parasittinfeksjoner i tarmen (Estrada, Yun et al. 1997). I tillegg kan  $\beta$ -glukan brukes i behandlingen av cøliaki, der et glutenfritt kosthold er nødvendig (Sadiq Butt, Tahir-Nadeem et al. 2008). Beta-glukan i havre består av mange løselige og fermenterbare fiberstoffer, og dette gjør havre til en potensielt utmerket prebiotikakilde som kan stimulere vekst av gode colonbakterier (Bunzel and Steinhart 2003).

#### 1.3.4 Fordøyelse av fiber

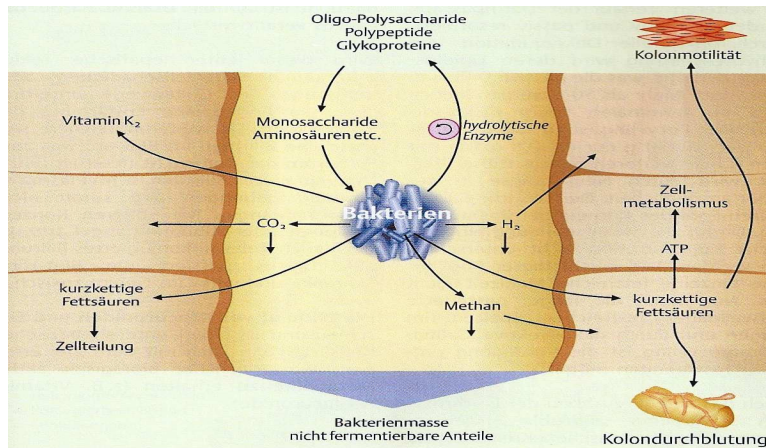
Fiberrike matvarer tygges lenger enn fiberfrie matvarer, og spyttsekresjonen i munnen økes (Biesalski 2000). I tillegg har geldannende kostfiber, som  $\beta$ -glukan i havre, sterk vannbindingsevne, noe som fører til økt viskositet av chymusmassen i magen (Bunzel and Steinhart 2003). Resultatet er langsommere magetømming og lengrevarende metthetsfølelse (Scheck 2002).

I tynntarmen forlenger de sterk oppsvulmende fiberstoffene, som cellulose i kli, transittiden gjennom jejunum, men øker farten gjennom ileum (Biesalski 2000). Dette fører samlet sett til at passasjetiden gjennom tynntarmen forkortes og at absorpsjons- og fordøyelseshastigheten minker (Bjørneboe and Aarsland 2005). Dette kan være fordelaktig, idet utskillelsen av helseskadelige stoffer i feces (frie radikaler, steroider) derved økes. Pytinsyre som finnes i fiber kan blant annet "binde opp" ugunstige kationer (Scheck 2002), og lignin har særlig høy affinitet for gallesyrer (Biesalski 2004).

Også passasjetiden gjennom colon forkortes ved inntak av fiber, og fecesvolumet blir større, både via direkte effekter og indirekte effekter (Biesalski 2000). Den direkte økningen skjer gjennom en såkalt "bulking effect" av de uløselige fiberstoffene, det vil si at chymusmassen binder til seg mye vann og svulmer opp (Kasper and Scheppach 2004). Indirekte sørger de fra tarmbakteriene fermenterte løselige fiberstoffene til samme resultat – ved at bakteriene får økt energitilgang, formerer

seg, og bakteriemassen tiltar (Biesalski 2000). Opptil 1/3 – 1/2 av fecesmassen kan utgjøres av bakteriell biomasse (Biesalski 2000).

### 1.3.5 Fermenteringsprosessen



**Figur 1.12** Skjematisk fremstilling av fermenteringsprosesser i colon (Biesalski and Grimm 2002) .

Anaerob nedbrytning (fermentering, gjæring) av karbohydrater foregår hovedsakelig i

proksimale colon, og avtar mot distale colon. Dette gjenspeiler seg også i pH verdien, som øker fra proksimale til distale colon. Pektin, resistent stivelse (stivelse som ikke ha blitt brutt ned i tynntarmen), beta-glukaner og andre løselige fiberstoffer, blir nedbrutt av colonsbakterier (fig.1.12), og det dannes en rekke fermenteringsprodukter, både gasser ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  og  $\text{H}_2$ ) og kortkjedede fettsyrer (eddiksyre/acetat, propionsyre/propionat og smørsyre/butyrat) (tab.1.2). De kortkjedede fettsyrene blir rask absorbert og kan dekke ca. 2-10 % av kroppens daglige energibehov og ca. 70% av colonepitelcellenes daglige energibehov (Biesalski 2000). De anaerobe bakteriene benytter seg av ca. 30% av den produserte energien til egen metabolisme og vekst, og dermed øker bakterieproliferasjonen i colon og bakteriemassen i feces (Huth and Büdingen 2004). Ved karbohydratfermentering reduseres ammoniakkonsentrasjonen i colon og mindre ammoniakk kommer over i blodet. På denne måten avlastes lever og nyre (Biesalski 2000). En mindre andel av de produserte kortkjedede fettsyrene forblir i colonlumen og virker surgjørende. Slik senkning av pH-verdien har trolig positiv virkning på den kvalitative og kvantitative sammensetning av tarmfloraen (Biesalski 2000). Den lave pH verdien hemmer oppvekst av uønskede bakterier (Scheck 2002) til fordel for de sakkaryolytiske (Biesalski 2000).

Proteiner nedbrytes og absorberes stort sett godt i tynntarmen, men en liten andel når også colon. Proteiner kan også fermenteres av tykktarmsbakterier (ca. 5-20 gram per dag), og dette har blitt kalt "forråtnelse", for å fremheve det faktum at flere av

metabolittene som da dannes er toksiske (ammoniakk, hydrogensulfid, aminer, fenoler, tioler og indoler) (Guarner and Malagelada 2003). Av grunner som tidligere er forklart, er proteinfermenteringen mest uttalt i distale deler av tykktarmen, og interessant nok er det nettopp i disse deler av colon at både betennelser og kreftsykdommer ofte oppstår (Vernazza, Rabiou et al. 2006).

End product	Bacterial group involved	Metabolic fate
Acetate	Bacteroides, bifidobacteria, eubacteria, lactobacilli, clostridia, ruminococci, peptococci, veillonella, peptostreptococci, propionibacteria, fusobacteria, butyrivibrio	Metabolised in muscle, kidney, heart and brain
Propionate	Bacteroides, propionibacteria, veillonella	Cleared by the liver, possible gluconeogenic precursor, suppresses cholesterol synthesis
Butyrate	Clostridia, fusobacteria, butyrivibrio, eubacteria, peptostreptococci	Metabolised by the colonic epithelium, regulator of cell growth and differentiation
Ethanol, succinate, lactate, pyruvate	Bacteroides, bifidobacteria, lactobacilli, eubacteria, peptostreptococci, clostridia, ruminococci, actinomycetes, enterococci, fusobacteria	Absorbed, electron sink products, further fermented to SCFA
Hydrogen	Clostridia, ruminococci, fusobacteria	Partially excreted in breath, metabolised by hydrogenotrophic bacteria

**Tabell 1.3** Oversikt over fermenteringsprodukter som dannes i tykktarmen ved sakkaryolittisk fermentering (Vernazza, Rabiou et al. 2006).

#### 1.4 IBS – en mikroflorasykdom?

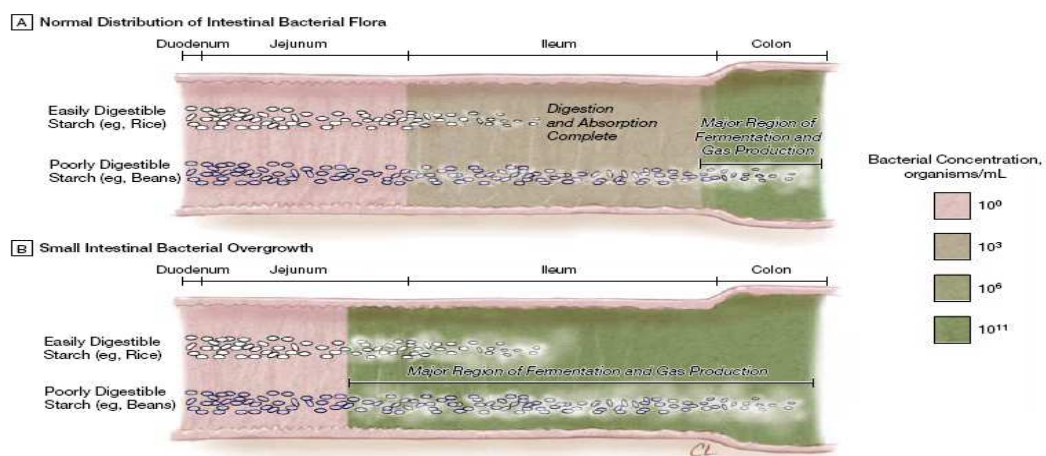
Bakteriell aktivitet i tykktarmen kan være involvert i utviklingen av en rekke sykdommer, som for eksempel IBS (Pimentel 2006). IBS står for ”irritable bowel syndrome” (norsk: irritabel tarm), og forekommer hos opp til 20 prosent av befolkningen (Pimentel 2006). IBS er en funksjonell lidelse, det vil si at tarmsystemets (hovedsakelig tykktarmens) funksjon er forstyrret, men uten at man kan påvise strukturelle eller biokjemiske avvik som kan forklare denne forstyrrelsen (Bullock and Jones 2006). IBS karakteriseres ved smerteproblematikk (ubehag), gassproblematikk (oppblåsthet) og avføringsproblematikk (diare og/ eller forstoppelse) (Mark Pimentel 2006). Lidelsen er verken farlig eller direkte livstruende, men kan være svært plagsom, og pasientene har som gruppe sterk nedsatt livskvalitet (Bullock and Jones 2006).

IBS er en eksklusjonsdiagnose, det vil si at andre årsaker til mage- og tarmproblemer først må utelukkes før diagnosen kan stilles. De såkalte Roma II kriteriene (se pkt.2.3), kan være nyttige for å stille diagnosen IBS (Pimentel 2006), men er likevel kun ”veiledende”, og brukes stort sett kun i forskningssammenheng fremfor daglig,

klinisk praksis. Det forskes for tiden videre for å finne andre og sikrere diagnosemetoder.

Patogenesen ved IBS er fortsatt ukjent (Parkes, Brostoff et al. 2008), men flere forklaringsmodeller har vært foreslått. En del nyere studier viser at bakteriefloraen i tykktarmen til IBS pasienter avviker i forhold til friske (Kässinen, Krogius-Kurikka et al. 2007) Man har blant annet funnet at antallet av de gode bakteriene som Bifidobacteria og Lactobacillus og coliforme er lavere hos IBS pasienter sammenlignet med friske personer (Bullock and Jones 2006). Det er også studier som taler for at pasienter med IBS kan ha en abnormal fermentering, blant annet med overproduksjon av gass (som fører til oppblåsthet og magesmerter) (Bullock and Jones 2006).

Bakteriell overvekst i tynntarmen (SIBO) har vært foreslått som mulig årsak til IBS (Quigley 2007). SIBO ("Small Intestinal Bacterial Overgrowth" = bakteriell overvekst i tynntarmen) er et begrep som brukes for å beskrive tilstander der tynntarmens bakterieflora er unormalt omfangsrik. Pasienter med SIBO produserer mer gass i tynntarmen (fig.1.13), og dette kan gi symptomer som minner om symptomene ved IBS (Pimentel 2006). Det er kjent at gassproduksjon i tynntarmen tolereres dårligere enn gassproduksjon i tykktarmen, trolig fordi tynntarmen reagerer på luminal gass med kontraksjoner (som gir smerter), mens tykktarmen relakserer (Harder, Serra et al. 2003). Bakteriefloaraen kan også komme i ubalanse etter gastrointestinale infeksjoner, og dette kan tenkes å være en av grunnene til såkalt post-infeksiøs IBS (Bjarnason and Bjarnason 2005).



**Figur 1.13** Fermentering og gassproduksjon ved SIBO. Fermentering og gassproduksjon skjer høyere i tarmen, og i større grad, hos pasienter med SIBO enn hos friske (Lin 2004).

## 1.5 Fibereffekt på IBS

Endel studier av kostfibervirkning ved IBS har vist at symptomene kan bedres ved behandling med kostfiber, men den kliniske nytten ved bruk av slik behandling er likevel fortsatt uklar (Aller, de Luis et al. 2004), og resultatene er ikke entydige (Bjørneboe and Aarsland 2005). Den mulig positive fibereffekten kan kanskje forklares ved at de produserte fettsyrene på en side senker luft smerter i sigmoideum, og på andre siden stimulerer tarmmotiliteten (Müller-Lissner 2005).

En del studier tyder på at IBS pasienter kan bli verre ved inntak av uløselige fibre, men bedre ved inntak av løselig fiber (Ford, Talley et al. 2008). Man har ved Haukeland Universitetssykehus lenge anbefalt bruk av havregrøt (som hovedsakelig inneholder løselig fiber) ved IBS, og har gode erfaringer med dette. Hvis problemet derimot stort sett er forstoppelse, kan imidlertid uløselig fiber være bra (**referanse**). Hvis man går ut fra at årsaken til IBS skyldes en ubalanse i tarmfloraen (Favier, Neut et al. 1997), kan det kanskje tenkes at havre kan hjelpe disse pasientene ved å fungere som prebiotikum, som forandrer tarmfloraen i gunstig retning?

## 1.6 Hensikten med oppgaven

Hensikten med studien var å undersøke om havregrøt har en positiv effekt på colonfloraen hos friske forsøkspersoner, målt ved bruk av urease som markør på en dårlig flora og beta-galaktosidase som mål på en god tarmflora. Resultatene kan senere sammenlignes med resultater fra pasienter med IBS. Et delmål var å sammenligne to ulike analysemetoder for fekal ureaseaktivitet.

### **Hypotese:**

En ukes behandling med havregrøt vil hos friske forsøkspersoner redusere fekal ureaseaktivitet og øke fekal beta-galaktosidaseaktivitet.

## 2 Materiale og metoder

### 2.1 Deltakere

10 friske frivillige av begge kjønn ble rekruttert fra universitets- og sykehusmiljøet. Eksklusjonskriterier var graviditet, personer under 18 år, og personer med mageplager eller alvorlig somatisk sykdom. Det ble dessuten benyttet et spørreskjema, basert på Roma II-kriteriene (se pkt.2.3), for å utelukke IBS blant forsøkspersonene.

Deltakerne fulgte en prosjektplan over 10 dager, der de første 3 dagene ble brukt til å samle inn avføringsprøver. Fra og med dag 4 til og med dag 10 spiste forsøkspersonene havregrøt en gang om dagen, og samlet inn avføringsprøver i de 3 siste dagene, fra dag 8-10. Forsøkspersonene ble bedt om å eliminere havre fra kostholdet i minst 2 uker før oppstart av prosjektet. I uken med spising av havregrøt, ble det ikke krevd ytterligere forandringer i kostholdet deres.

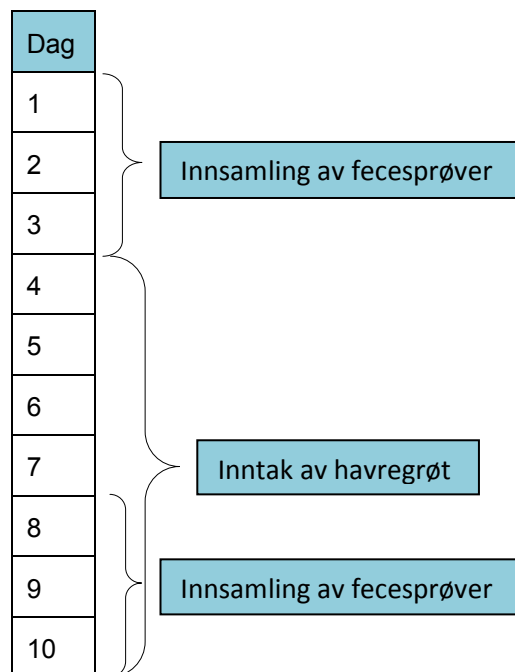


Fig. 1.14 Oversikt over prosjektplanen forsøkspersoner fulgte over 10 dager.

### 2.2 Etikk

Det ble innhentet skriftlig, informert samtykke fra alle deltakerne. Studien ble godkjent av Regional komitè for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, Vest-



Norge (REK Vest) (vedlegg 1), og meldt til personvernombudet for forskning, Norsk samfunnsvitenskapelig datatjeneste A/S (vedlegg 2).

### **2.3 Roma II skjema**

”Roma II kortversjon” er et spørreskjema som ble brukt i denne oppgaven (vedlegg 3), og som baserer seg på Roma II-kriteriene fra 1999. Navnet kommer av at kriteriene ble laget på et konsensumøte i Roma. ”Roma II kortversjon” er en grei måte å kartlegge funksjonelle mageplager på. Spørreskjemaet er inndelt i to avsnitt: Det første avsnittet omhandler de kriteriene som kreves for å stille diagnosen IBS i henhold til Roma II kriteriene. Der må pasientene svare ja eller nei. Den andre delen er hentet fra Kane et al. (Kane, Sandborn et al. 2003) og består av en symptomskala, der symptomene kvalme, oppblåsthet, magesmerter, forstoppelse, diarè og anoreksi (ulyst på mat) skal kvantiteres ved bruk av en skala fra 0-10, der 0 = ingen symptomer og 10 = alvorlige symptomer. Total score får man ved å legge sammen verdiene som gis for hvert symptom, og maksimal score er således 60.

I min studie ble svarene brukt til å ekskludere forsøkspersoner med IBS. De skulle derfor besvare de fleste spørsmålene med nei. Testpersoner med bare noen få positive svar, ble likevel ikke helt utelukket, da dette ble vurdert skjønnsmessig i hvert enkelt tilfelle, av en lege.

### **2.4 Havregrøt**

Det ble valgt ”Bjørn store havregryn” fra AXA. Dette produktet inneholder havregryn med mye kostfiber med (10,6g/100g). Havregrynsgrøt ble laget til etter egen oppskrift, der 1,5 dl (60 g) store havregryn ble kokt med 2 ½ dl vann til grøt. Etter behov ble det tilsatt sukker, kanel eller rosiner. Inntaket ble dokumentert i en egen ”dagbok” (vedlegg 4).

### **2.5 Innsamling av fecesprøver**

Hver forsøksperson samlet inn fecesprøver i til sammen 6 døgn, etter prosedyre beskrevet i vedlegg 5. Hver boks ble merket med dato, testpersonens navn og et tildelt nummer fra 1A/B til 10A/B (1-10 var forsøkspersonens nummer, A stod for fecesprøver samlet inn før behandling med havregrøt, og B for fecesprøver samlet

inn etter behandling med havregrøt). Etter innleveringen til Haukeland Universitetssykehus ble prøvene oppbevart ved 20 minus grader.

## 2.6 Analyse-beskrivelser

Det ble brukt en enzym-substrat-analyse for å måle beta-galaktosidaseaktivitet i avføringen. For å måle ureaseaktivitet, ble det benyttet to ulike metoder, som senere ble sammenliknet. Den ene metoden er en modifisert enzymanalyse etter Worthington (Worthington Biochemical Corporation Urease Assay), den andre måler urease ved hjelp av såkalt ”rapid urease test” (samme test som er i daglig bruk i klinikken, for indirekte påvisning av *Helicobacter pylori* i biopsier fra mageslimhinnen). For å kunne frigjøre mest mulig enzymer i avføring, ble alle prøvene først homogenisert (pkt.2.6.1).

### 2.6.1 Homogenisering

Homogeniseringsprosessen ble utført i flere trinn for optimal homogenisering. Urease-metodene ble homogenisert i 2 trinn, og beta-galaktosidaseanalysen i 3 trinn for å bedre frigjøre enzymene. For innveieg ble en vekt fra fra Mettler PC 4400 (Tyskland) benyttet. For homogenisering ble to ulike homogenisator-apparater benyttet, (Ultra-turrax ”T50 basic” fra IKA-Werke, Tyskland og Ultra-Turrax ”T25 basic” fra Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Tyskland), og en ultralyd-homogenisator (Ultrasonic prosessor fra Sonics, Tyskland). Annet utstyr som ble benyttet ved homogeniseringsprosessen: en sentrifuge (”Baby Bug” fra Tehnica, Latvia), destillert vann, pipetter (Biohit), 2ml prøveglass (Sarstedt, Tyskland) og en detergent (10% Triton-X-100).

Første homogeniseringstrinn startet med at de nedfryste fecesprøvene ble veid i hver sin boks, og fecesvekten ble notert (både per døgn, og den totale fecesvekten fra alle 3 døgn for henholdsvis før og etter behandling med havregrøt). Deretter ble det tilsatt fire ganger så mye vann i hver fecesboks (4 x døgnfeces), og etter bløtlegging av fecesprøvene ble alle 3 boksene fra samme testperson blandet sammen i en stor bøtte. Deretter ble alt grovt homogenisert ved hjelp av Ultra-Turrax T50 basic med full hastighet (10000 rpm), inntil avføringskonsistensen var flytende. De grovt homogeniserte prøvene ble pipettert i flere små 10 ml glass og nedfryst igjen.

Andre homogeniseringstrinn ble startet rett før analysen av beta-galaktosidase og de to ureasemetodene. Et glass av de nedfryste, grovhomogeniserte prøvene ble tint opp ved romtemperatur og deretter fortynnet med vann, inntil man hadde et sluttforhold av 8:1. For en enklere homogenisering, ble 5ml av de fortynnete fecesprøvene pipettert over i et nytt 10ml glass. For beta-galaktosidase enzymanalysen ble det dessuten brukt en detergent for å bryte ned cellveggene. For dette ble Triton-X-100 tilsatt, slik at sluttkonsentrasjonen i feces ble 1 % (hver 5 ml prøve ble tilsatt 0,5 ml av 10 % T-X-100). Alt ble godt blandet, og etter 5 minutters venting ble alt homogenisert for andre gangen (gjelder også for urease analysen), men denne gangen med Ultra-Turrax T25, som brukes for en finere homogenisering. Etter 15 sekunder med hastighet 24000 rpm ble prøvene satt på is i 5 minutter. Prøvene som trengtes for urease analysen ble nå sentrifugert ved 8000 rpm i 1 minutt.

For beta-galaktosidaseanalysen måtte prøvene homogeniseres ytterligere to ganger (à 15 sekunder, med 5 minutters pause mellom). For dette ble det brukt en ultralydhomogenisator (Ultrasonic prosessor fra Sonics). Denne ble innstilt (kontinuerlig) på 60 amplituder (7 Watt). Etter ultralydhomogeniseringen ble 2 ml pipettert over i et mindre prøveglass, og sentrifugert i 5 minutter ved 3000 ppm.

## 2.6.2 Beta-galaktosidase enzymanalyse

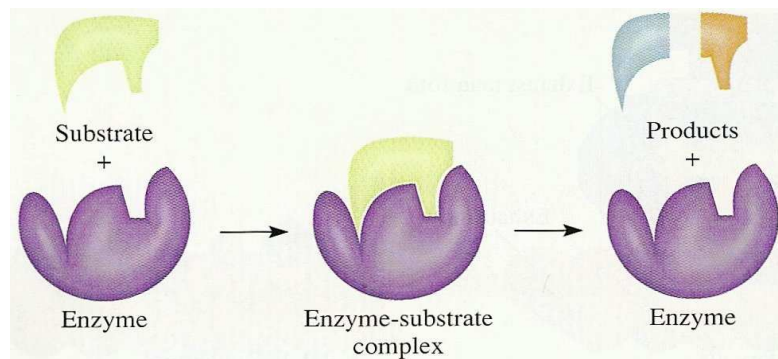
### Mål

Formålet med denne enzymanalysen var å bestemme fekal beta-galaktosidase aktivitet før og etter behandling med havregrøt.

### Prinsipp

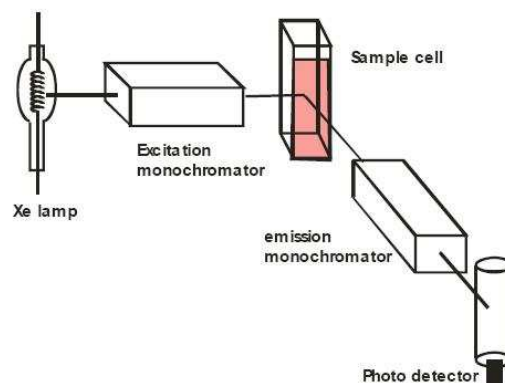
Analysen er basert på informasjon fra et arbeid av Andersen & Skagen (Andersen and Skagen 1983). Utgangspunkt for analysen er enzym-substrat kompleks dannelse ( $E+S \rightleftharpoons E \cdot S \rightleftharpoons E+P$ ) (fig.2.1). I denne analysen er enzymet (=E) beta-galaktosidase som finnes i avføringsprøvene. Som substrat (= S) brukte vi en arbeidsløsning, bestående av 4-metyl-umbelliferyl-B-D-galaktopyranosid i en bufferløsning. Vi kan ikke måle beta-galaktosidase direkte, kun mengden produkter (=P) som dannes i enzym-substrat-kompleks reaksjonen. Produktet for denne reaksjonen er metylumbelliferon. Til å kvantitere produktet metylumbelliferon ble det laget en

standard (tabell 2.1). Ut fra standardkurven (fig.2.2) kunnen vi bestemme beta-galaktosidase aktiviteten siden antall mol dannet methylumbelliferon tilsvarer et mol beta-galaktosidase. For å stoppe reaksjonen ble glycin benyttet som stoppreagens.



**Figur 2.1** Formasjon av et enzym-substrat-kompleks (Chang 2006).

For beregning av metylumbelliferon og konsentrasjonen til beta-galaktosidase, ble det benyttet et fluorescence spektrofotometer. Den kan måle fluorescence (luminescence) av et stoff ved å sende ut lys med bestemte bølgelengder (ultraviolet lys). Skjematisk kan det tegnes slik:



**Figur 2.2** Skjematisk fremstilling av en fluorescence spektrofotometer  
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/c/ca/Spectrophotometer.JPG>.

Lampen i fluorescence spektrofotometer sender ut lys med en bestemt bølgelengde. Den første monokromatoren (en monokromator er et filter som overfører lys av en bestemt bølgelengde med en bestemt toleranse og som skal minke spredning av lyset) slipper kun gjennom kortbølget lys og aktiverer prøven i cella (brønn) som fluorescerer. Den andre monokromator slipper kun gjennom lys med lange bølgelengder. Detektoren måler intensiteten av lyset som ble sluppet gjennom cella.

På instrumentet som ble brukt i analysen, skal det veksles mellom 4 ulike celler/brønnløsninger.

Den ene celle(brønn) ble kalt prøve1 (pr.1), og inneholdt det oppløste absorberende stoffet (fecesprøver), buffer, substrat, og glycin som ble tilsatt etter inkubasjonen. De andre cellene (brønner) ble kalt prøve01 (pr.01), prøve02 (pr.02) og prøve03 (pr.03), og inneholdt blindprøver. En blindprøve er oppløsningsmiddel som prøven er oppløst i, og disse prøvene brukes for å finne bakgrunnen til de enkelte tilsatte løsninger. En bakgrunn er en falsk absorbans som har ingenting med reaksjonen å gjøre. Det betyr at de fra blindprøvene avleste verdier som man får fra spektrofotometer, er bare falske tall som man må trekke fra slik at man får reelle tall for totalreaksjonen, og for å kunne bestemme beta-galaktosidaseaktiviteten. Siden det var flere oppløsningsmidler i prøve1, ble det benyttet 3 ulike celler (brønner) med blindprøver.

Prøve01 inneholdt ingen substrat før inkubasjonen, denne ble tilsatt etter stoppreagens glycin, slik at ingen reaksjon ble startet under inkubasjonen. Denne blindprøven ble benyttet for å beregne bakgrunnen da alle komponentene var tilstede. Prøve02 manglet fecesprøver, men alle andre komponentene var tilstede. Denne prøven gir oss bakgrunn til substrat. Prøve03 manglet både fecesprøver og substrat før inkubasjonen og disse ble benyttet for å finne bakgrunnen av buffer, substrat og stoppreagens uten at disse reagerte med hverandre. Den nøyaktige sammensetningen og oversikt over de enkelte paralleller finnes i figur 2.2.

### **Materiale**

Følgende utstyr ble benyttet: Fecesprøver, inkubator ("Inkubator 1000" fra Heidolph instruments, Tyskland), rister ("Unimax 1000" fra Heidolph instruments, Tyskland), fluorescence spektrofotometer ("Spectramax GEMINEM" fra Molecular devices), 4 stk. 96 brønnersplateplater (fra Nunc), engangspipetter (200 µl-5ml, fra Biohit), en 10µl-50µl pipette ("Multipipette plus" fra Eppendorf). I tillegg krever metoden flere løsninger som ble klargjort før oppstart av analysene:

1. 100 ml buffer, bestående av 0,572 ml 100 % eddiksyre + 0,0467g NaCl + 0,1% Triton-X-100 med pH av 3,5.

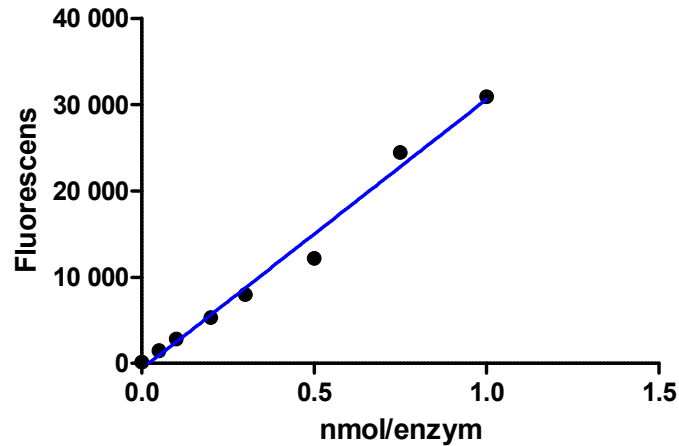
2. Substrat, bestående av 10mM 4-metylbelliferyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid, MW= 338; 0,0169/ 5 ml N.N. dimetylformamid
3. ”Arbeidsløsning”, bestående av 0,1 ml substrat (se 2.)+ 0,6 ml buffer (må lages ny for hver analysedag)
4. Stock, bestående av 10 mM metylbelliferon i tørket methoxyethanol (0,0176g / 10ml). (En ”stock” – ”stamløsning” er en konsentrert løsning som brukes som utgangspunkt for videre fortynninger, og som brukes til å forbedre nøyaktigheten til løsningen man ønsker å jobbe videre med. I dette tilfellet var det standardløsningen).
5. Standardarbeidsløsning (SAL), bestående av 50ml Stock + 4950  $\mu$ l buffer
6. 50 mM glycin/ 100ml = 3,76g glycin + 1,86g EDTA triplex, pH: 10,4
7. Stoppløsning, bestående av 200 $\mu$ l glycin som fortynnes med kaldt, destillert vann i forholdet 1:10.

### **Praktisk gjennomføring**

Standarden ble utviklet ved Institutt for indremedisin, Universitetet i Bergen. Det ble laget 8 standardløsninger ved fortynning av standardarbeidsløsningen (SAL) med buffer, etter oppskrift i tabell 2.1. 25  $\mu$ l ble pipettert ut fra hver av disse, og tilsatt brønnene i Nuncliplaten. Deretter ble 25  $\mu$ l buffer og 200  $\mu$ l glycin med EDTA (fortynnet 1:10) tilsatt hver brønn. Brønnplaten ble satt inn i spektrofotometeret og avlest ved bølgelengde 365nm i ekstensjon (EX) og 460nm i emisjon (EM), og standardkurven ble satt opp (se fig.2.2).

Standard	nmol/enzym	SAL i $\mu$ l + Buffer
1.	0,0	0 + 1000
2.	0,05	20 + 980
3.	0,1	40 + 960
4.	0,2	80 + 920
5.	0,3	120 + 880
6.	0,5	200 + 800
7.	0,75	300 + 700
8.	1,0	400 + 600

**Tabell 2.1** Standard for beta-galaktosidaseanalyse. Standardarbeidsløsning (SAL) = 50  $\mu$ l stock + 4950  $\mu$ l buffer.



**Figur 2.3** Standardkurve for beta-galaktosidase-enzymanalyse. Fluorescens/lysintensitet angir mengden beta-galaktosidase som kvantifiseres ved hjelp av standardkurven. Fluorescens er stigning av beta-galaktosidase enzymet.

Etter at standarden og de brukte løsninger ble laget, ble fecesprøvene tint opp ved romtemperatur og homogenisert for andre gang (se pkt.2.6.1). Deretter ble disse satt på is. En Nuncplate med 96 brønner ble brukt for maksimalt 5 forskjellige fecesprøver. Platen ble inndelt i 8 prøve1 (pr.1) paralleller for hver forsøksperson og tilsvarende 8 paralleller med prøve01 brønn. Fra prøve02 og prøve03 brukte vi kun 8 brønnparalleller på en brønnplate.

Prøve1 (pr.1) = 35 µl buffer + 10 µl fecesprøve + 5µl substrat $\xrightarrow{\text{Inkub}}$ 200 µl glycin
Prøve02 (pr.01) = 35 µl buffer + 10 µl fecesprøve $\xrightarrow{\text{Inkub}}$ 200 µl glycin + 5 µl substrat
Prøve03 (pr.02) = 35 µl buffer + 5µl substrat $\xrightarrow{\text{Inkub}}$ 200 µl glycin
Prøve04 (pr.03) = 35 µl buffer $\xrightarrow{\text{Inkub}}$ 200 µl glycin + 5 µl substrat

**Figur 2.4** Sammensetningen av prøve1, og blindprøver 01, 02 og 03, som ble tilsatt brønnplaten.

35 µl buffer ble tilsatt alle brønnene. Deretter ble 10 µl sentrifugat fra fecessuspensjon pipettert over i alle brønnene avsatt for prøve1 og prøve01. Det var viktig at man kun utpipetterte prøvenes sentrifugat, og ikke bunnfallet (både fordi dette kan tette igjen pipettene, og fordi analyse av bunnfallet kan gi falske forhøyede verdier for enzymreaksjon). I prøve 02 og 03 ble det tilsatt 10 µl buffer i stedet for 10 µl fecesprøver. I neste trinn ble 5 µl arbeidsløsning (=substrat) tilsatt i alle prøve1 brønner, og i alle prøve02 brønner. Etter tilsetning ble brønnplaten satt i inkubator (37 °C i 30 min), og samtidig ristet med UNIMAX 1000 ved hastighetstrinn 6. Etter

inkubasjonen ble 200 µl iskaldt glycin tilsatt i alle brønnene, for å stoppe reaksjonen (Andersen and Skagen 1983). Til slutt ble 5 µl substrat tilsatt i paralleller som ikke hadde fått tilsatt substrat før inkubasjonen (gjaldt blindprøvene 01 og 03).

Deretter ble brønnene avlest for fluorescens i spektrofotometeret med samme bølgelengde og betingelser som standardplaten. Platen ble kjørt parallell med de i PC-programmet lagrete resultatene fra standardplaten, og vi fikk resultater for både prøve1, og blindprøvene 01, 02 og 03. For avlesning av resultatene brukte vi softwareprogrammet Softmax Pro, versjon 5.

### **Beregninger:**

Enzymaktivitet angis som Unit/gram (Andersen and Skagen 1983). 1Unit er andelen av enzymer (beta-galaktosidase) som hydrolyserer 1 µmol av substrat (metylumbelliferon) per minutt ved 37°C (Florent, Flourie *et al.* 1985). For å få resultatet til den endelige beta-galaktosidaseaktiviteten i fecesprøvene, ble hvert enkelt løsnings som vi tilsatte i prøve1 brønnene, subtrahert. Resultatene ble beregnet ved følgende formel:

$$(((\text{avlest pr.1} - \text{pr.01.}) - (\text{pr.02.} - \text{pr.03.})) \times 1000 \times \text{fortynning}) / (\text{volum/tid}) = x$$

**Fig.2.5** Formel for beta-galaktosidase beregning. Det ganges med 1000 for å få enheten mU/ml. Fortynningen er (1:8), fecesmengden/volum (5ml) og inkubasjonstiden 30 min.

### **2.6.3 Urease enzymanalyse modifisert etter Worthington**

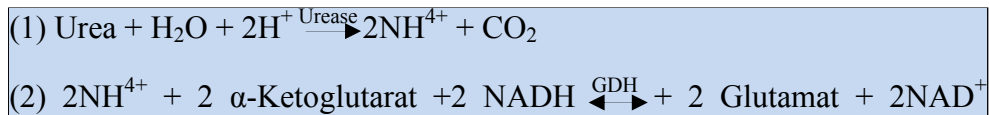
#### **Mål**

Formålet med denne analysen var å beregne fekal ureaseaktivitet før og etter behandling med havregrøt. Resultatene skulle dessuten brukes for sammenlikning med resultatene for ureaseanalysen etter "rapid urease testen" (pkt.2.6.4).

#### **Prinsipp**

Worthington Biochemical Corporation har utviklet en metode for å bestemme ureaseaktivitet ved å koble hydrolyse av urea til dannelsen av glutamat. Ved hydrolyse av urea dannes ammoniumioner (se fig. 2.3-(1)), og disse kan brukes til å danne glutamat og NAD<sup>+</sup> (se fig. 2.3-(2)).





**Fig.2.6** Kobling mellom urea produksjon (1) og glutamat dehydrogenase reaksjon (2), brukt i analysemetoden.

En vanlig spektrofotometer måler lysabsorpsjon (elektromagnetisk stråling) av et oppløst stoff ( $\text{NAD}^+$  i denne analysen) i form av ulike bølgelengder. Skjematisk kan det tegnes slik:



Lampen i spektrofotometer sender ut lys med forskjellige bølgelengder. Monokromatoren fungerer som et filter og slipper kun gjennom lys med den bølgelengden vi ønsker. I cella (brønn) har vi det absorberende stoffet, og detektoren måler intensiteten av det lyset som slipper gjennom cella.

En forandring av bølgelengden kan brukes til å måle konsentrasjonen til  $\text{NAD}^+$ . Utfra en standardkurve kan ureaseaktivitet bestemmes ved at vi vet at en unit urease gir oksidasjon av et  $\mu\text{mol}$   $\text{NADH}$  til et  $\mu\text{mol}$   $\text{NAD}^+$  per minutt (ved  $25^\circ\text{C}$  og  $\text{pH}$  7.6) (Worthington 2009)

Denne enzymanalysen ble modifisert av Institutt for indremedisin, Universitetet i Bergen. Modifiseringen ligger i at mengden arbeidsløsning er endret i forhold til den opprinnelige metoden.

### **Materiale**

Det ble brukt et spektrofotometer ("Spektra max plus 384" fra Molecular Derices), pipetter (fra Biohit), 96 brønnersplate (fra Nunc), inkubator ("Inkubator 1000" fra Heidolph instruments, Tyskland), 2ml prøveglass (fra Sarstedt), avføringsprøver, og følgende kjemikalier og løsninger: 0,1 M Kaliumfosfatbuffer (PBS) med  $\text{pH}$  7.6, 0,023 M Adenosin-5'-difosfat (ADP), 0,0072 M  $\text{NADH}$ , 0,026 M  $\alpha$ -ketogularat, 1,8 M Urea og Glutamat dehydrogenase (GLDH). Alle kjemikalier som ble brukt, kommer fra Sigma-Aldrich.

## Praktisk gjennomføring

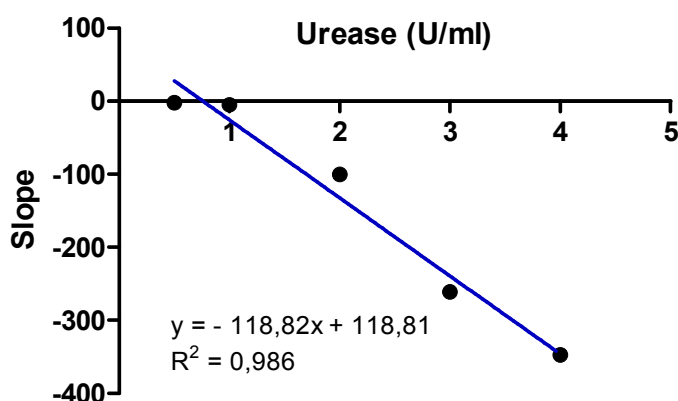
Etter homogenisering (pkt.2.6.1), ble det laget en arbeidsløsning (tab.2.3, 25 ml for hver 96 brønns Nunclate). 18 forskjellige prøver kan analyseres i en brønnplate. Det ble benyttet en standard for urease (tab.2.4), som ble utviklet ved Institutt for indremedisin, Universitetet i Bergen. Fra denne ble laget ca. 1ml standardstockløsning som besto av 10 mg/ml = 10 U/ml urease, som så ble fortynnet (med fosfatbuffer, PBS, vedlegg 6) i 5 nye fortyninger: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, og 4.0 mg/ml urease, etter oppskrift vist i tabell 2.3.

Mengde arbeidsløsning for 25ml	Brukte kjemikalier	Vekt i molekularvekt (MW) og i g/10ml
20 ml	0,10 M PBS, pH	(Se vedlegg 7)
1 ml	0,023 M ADP	427,2 MW = 0,098 g/10 ml
1 ml	0,0072 M	741,6 MW = 0,054 g/ 10 ml
1 ml	0,026 M $\alpha$ -	184,2MW = 0,048 g/ 10 ml
1 ml	1,8 M Urea	60,06MW = 1.08 g/ 10 ml
1 ml	500 U/ml	3630 U/ml= 0,183 ml + 0,862 ml

**Tabell 2.2** Oversikt over sammensetning av arbeidsløsningen for den modifiserte ureaseanalysen etter Worthington.

Brukte ureasemengder	Urease	PBS
0,5	50 $\mu$ l	950 $\mu$ l
1,0	100 $\mu$ l	900 $\mu$ l
2,0	200 $\mu$ l	800 $\mu$ l
3,0	300 $\mu$ l	700 $\mu$ l
4,0	400 $\mu$ l	600 $\mu$ l

**Tabell 2.3** Standardstock og tilsatte løsninger for standard til ureaseanalysen.



**Figur 2.6** Standardkurven for ureaseanalysen etter Worthington. Slope = fall i ureaseabsorpsjonen.

Nunc platen ble inndelt slik at hver forsøkspersons avføringsprøve ble analysert i 4 paralleller, og det ble brukt 4 paralleller for hver av de 5 fortynnete standardløsningene.

10 µl av hver standardløsning og 10 µl av hver fecesprøve ble utpipettert i respektive brønner. Deretter ble arbeidsløsningen varmet opp til romtemperatur og inkubert i 10 minutter ved 25 grader. Etter oppvarmingen ble 200µl arbeidsløsning tilsatt i alle brønnene. Dette måtte skje raskt, fordi urease i fecesprøvene setter reaksjonen i gang med en gang prøvene kommer i kontakt med arbeidsløsningen. Deretter ble brønnplaten plassert i spektrofotometeret, innstilt ved 340nm (=A340nm) (kinetisk måling i 20 sekunders intervaller). Spektrofotometer ble koblet til en PC, og absorbansen kunne avleses i form av fall i lysabsorpsjonen fra 340nm slik at vi fikk  $\Delta A_{340nm}$ . Ut fra de i PCen avleste resultater, kunne ureaseaktiviteten bestemmes ved bruk av standardkurven. Programmet Soft Max Pro, versjon 5, ble benyttet til dette.

#### **2.6.4 Urease analyse etter ”rapid urease test”**

##### **Mål**

Formålet med denne analysen var å beregne fekal ureaseaktivitet før og etter behandling med havregrøt. Resultatene skulle dessuten brukes for sammenlikning med resultatene for ureaseanalysen etter Worthingtonmetoden (pkt.2.6.3).

##### **Prinsipp**

”Rapid urease test” ble benyttet som grunnlag for denne analysen. Denne testen brukes vanligvis for å diagnostisere *Helicobacter pylori*-infeksjon i magesekken ved å ta en biopsi av antrumslimhinne. Denne tilsettes i en løsning, sammen med urea og fenolrød som indikator. Ureaseenzymet som produseres av *Helicobacter pylori*, hydrolyserer urea til ammoniumioner og bikarbonat. Dette øker løsningens pH verdi, og dette avleses (visuelt; med ”det blotte øye”) som en fargeforandring. Ved et positiv utslag for urease, forandres fargen av indikatoren fra gul til magentarød. I dette prosjektet ble avføring benyttet i stedet for antrumbiopsier.

## **Materiale**

Følgende utstyr ble benyttet: sentrifuge ("Baby Bug" fra Tehtrica), 2ml reagensglass (fra Sarstedt), 96 brønnsplater (fra Nunc), engangs-pipetter (fra Biohit), destillert vann, Jack bean urease, fenolrød, HCl og homogeniserte avføringsprøver fra forsøkspersonene.

## **Praktisk gjennomføring**

For denne metoden brukte vi en standardkurve (vedlegg 7) utviklet ved Institutt for indremedisin, Universitetet i Bergen, laget ved hjelp av Jack bean urease.

De ved romtemperatur opptinte og grovt homogeniserte fecesprøvene ble homogenisert for andre gang (se pkt. 2.6.1), og ca. 2ml av hver prøve (kun sentrifugat, ikke bunnfallet) ble pipettert over i et mindre reagensglass. Prøvene stod på is i løpet av hele analysen. Deretter ble substrat- og arbeidsløsningen tillaget:

Substratløsning = 2 g urea + 20 ml destillert vann + 20 dråper fenolrød Arbeidsløsning = 0,1ml 42mM HCl + 20 ml substratløsning
--

**Fig.2.6** Sammensetning av substrat- og arbeidsløsningen.

2 forskjellige analysemetoder ble utført parallelt: Både i en 96 brønnplate fra Nunc, og i vanlige reagensglass, der de tilsatte løsninger ble sentrifugert i 1 minutt (ved 3000 rpm). De bruktes 2 ulike metoder for å teste om løsningene som tilsettes i et større prøveglass, og som i tillegg blir sentrifugert, viser en annen tidspunkt for fargeforandringen. For begge metodene ble 10µl fecesprøve blandet med 200 µl arbeidsløsning. Deretter ble tidspunkt for fargeskiftet visuelt registrert og notert. Etter 180 min ble analysen avsluttet, og prøvene som ikke hadde skiftet farge til magentarødt frem til dette tidspunktet, ble betraktet som negative for ureaseaktivitet. For de positive prøvene, ble antall minutter notert. Ureasekonsentrasjonen ble avlest ved hjelp av standardkurven (vedlegg 8). Resultatet ble angitt som gjennomsnittet av begge analysemetodene.

## **2.7 Statistikk**

Data ble analysert ved bruk av statistikkprogrammet GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt ± standardavvik (SD). Tosidig, paret t-test ble brukt for å sammenlikne data før og etter

behandling med havregrøt, og Pearsons korrelasjonsanalyse ble brukt for å beregne grad av korrelasjon mellom data. P-verdier  $<0.05$  ble regnet som statistisk signifikante.

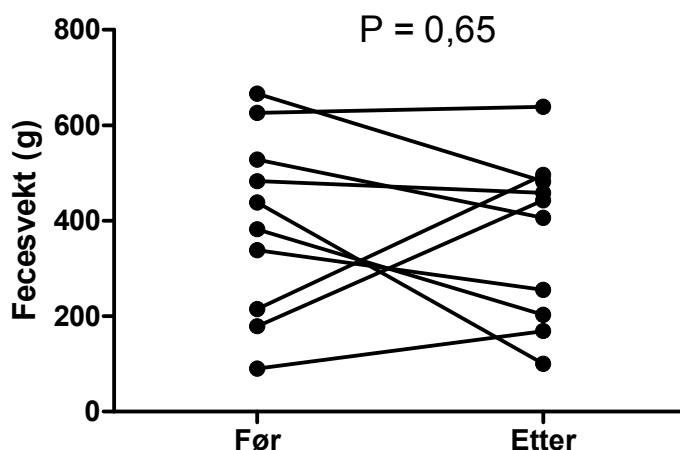
### 3 Resultater

#### 3.1 Demografi

Forsøkspersonene besto av 8 kvinner (80 %) og 2 menn (20 %). Disse var mellom 22 og 49 år gamle, med gjennomsnitt  $28 \pm 8.9$  år. Kroppsmasseindeks (BMI) lå mellom 18,26 og 27,78 kg/m<sup>2</sup>, med gjennomsnitt  $23 \pm 2.9$  kg/m<sup>2</sup>.

#### 3.2 Fecesvekt

Total fecesvekt (3 døgn) før havregrotinntak varierte mellom 90 og 666 g, med gjennomsnitt  $394,5 \pm 191,4$  g. Total fecesvekt etter havregrotinntak varierte mellom 100 og 639 g, med gjennomsnitt  $365,1 \pm 173,0$  g (fig. 3.1). Fecesvekten varierte sterk mellom de enkelte forsøkspersonene, og det var ingen forskjell i total fecesvekt før og etter behandling med havregrot ( $P=0,65$ ).

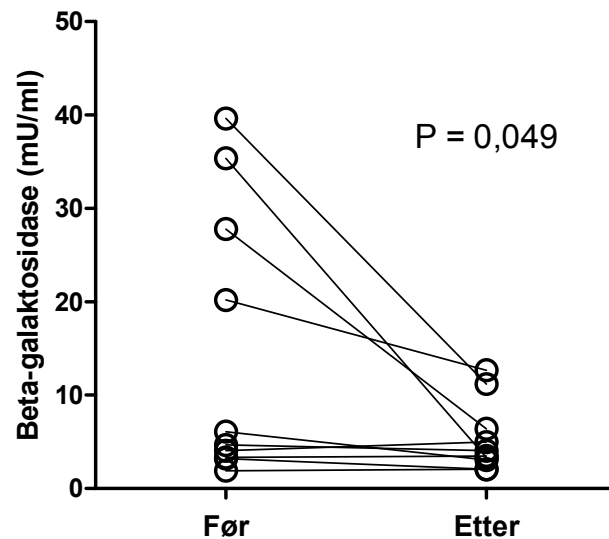


Figur 3.1 Total fecesmengde (3 døgn), før og etter behandling med havregrot.

#### 3.3 Beta-galaktosidase aktivitet

Utgangsverdiene før behandling med havregrot varierte sterkt mellom forsøkspersonene: 4 av dem hadde utgangsverdier mellom 20 og 40 mU/ml, mens resten av gruppen lå mellom 1,9 og 6,1 mU/ml. Verdiene etter behandling med havregrot varierte i mindre grad: Mens 2 av forsøkspersonene hadde en beta-galaktosidase over 11 mU/ml, hadde de resterende 8 verdier mellom 2,1 og 6,4 mU/ml. Beta-galaktosidaseaktiviteten gikk hos de fleste forsøkspersonene ned etter

behandlingen med havregrøt, og paret t-test viste at denne forskjellen var statistisk signifikant med P-verdi 0,049. Beta-galaktosidaseaktivitet før havregrøtsbehandlingen var  $14,6 \pm 14,8$  mU/ml, og  $5,3 \pm 3,7$  mU/ml etter havregrøtsbehandlingen. Interessant nok hadde forsøkspersonene med de høyeste utgangsverdiene størst reduksjon i beta-galaktosidaseaktivitet etter havregrøtsbehandlingen.

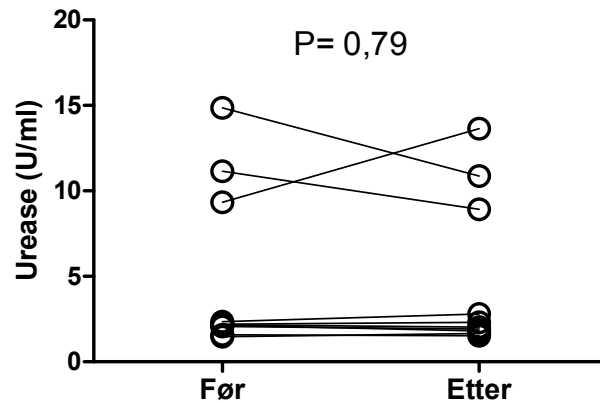


**Figur 3.2** Sammenligning av fecal beta-galaktosidase aktivitet hos friske forsøkspersoner, før og etter behandling med havregrøt.

### 3.4 Urease aktivitet

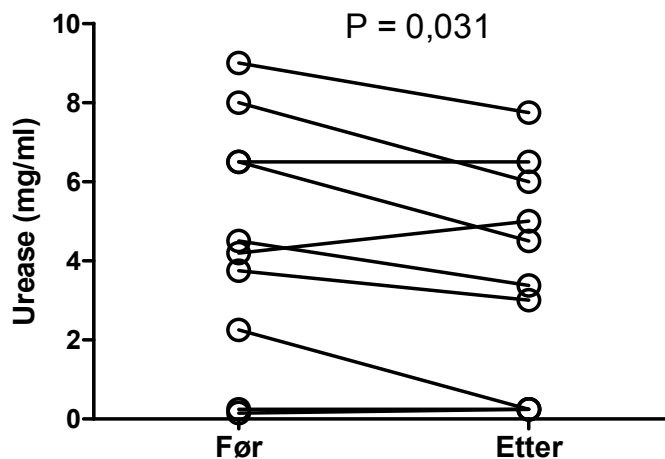
Urease analysen etter Worthington viste gjennomsnittsverdier i fecal ureaseaktivitet på  $4,9 \pm 4,9$  U/ml før behandling med havregrøt, og  $4,8 \pm 4,6$  U/ml etter havregrøtinntaket.

Tre av forsøkspersonene hadde særlig høye utgangsverdier for ureaseaktivitet, og disse skilte seg også ut fra resten av materialet etter havregrøtsbehandlingen. Ureaseaktiviteten endret seg i liten grad hos resten av forsøkspersonene, og det var samlet sett ingen forskjell i ureaseaktivitet før og etter havregrøtinntak ( $P = 0,79$ ).



**Figur 3.3** Sammenligning av ureaseaktivitet i avføringen hos friske forsøkspersoner, målt med "Worthingtonmetode", før og etter behandling med havregrøt.

Det var derimot en statistisk signifikant forskjell i ureaseaktivitet før og etter havregrøtinntak målt med "rapid urease test"-metoden ( $P = 0,031$ ). Med denne metoden var gjennomsnittsverdien av ureaseaktivitet  $4,51 \pm 3,04$  mg/ml før havregrøtinntaket, og  $3,69 \pm 2,75$  mg/ml etter havregrøtinntak. Seks av forsøkspersonene fikk redusert fekal ureaseaktivitet etter havregrøtsbehandling, mens den ble økt hos 2 og forble uendret hos 2.

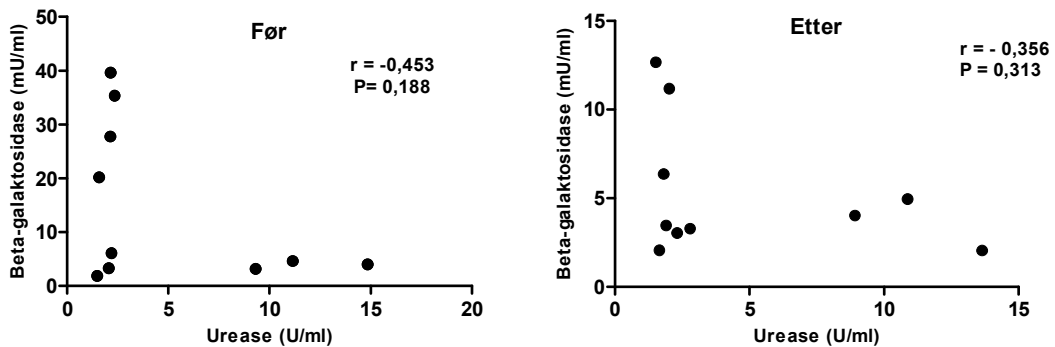


**Figur 3.4** Sammenligning mellom fekal ureaseaktivitet, målt med "rapid urease test", før og etter behandling med havregrøt.

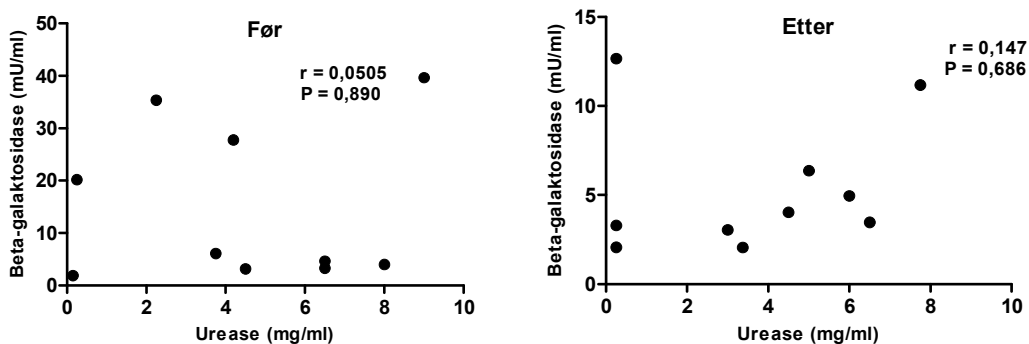


### 3.5 Korrelasjon mellom beta-galaktosidase og urease aktivitet

Det var ingen statistisk signifikant korrelasjon mellom beta-galaktosidaseaktivitet og ureaseaktiviteten (målt med begge ureasemetoder), verken før eller etter inntak av havregrøt (fig. 3.5 og 3.6).



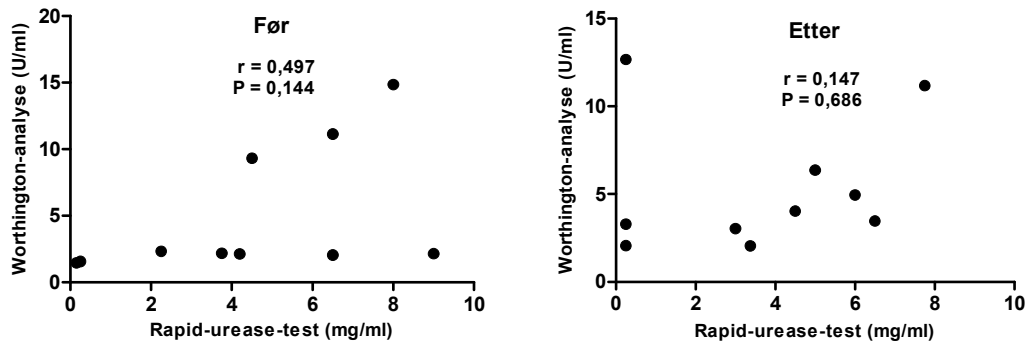
**Figur 3.5** Korrelasjon mellom fecal beta-galaktosidase og ureaseaktivitet etter (Worthington), før (venstre) og etter (høyre) inntak av havregrøt.



**Figur 3.6** Korrelasjon av fecal beta-galaktosidase og ureaseaktivitet ("rapid-urease-test"), før (venstre) og etter (høyre) inntak av havregrøt.

### 3.6 Korrelasjon mellom Worthington urease analyse og "rapid-urease-test"

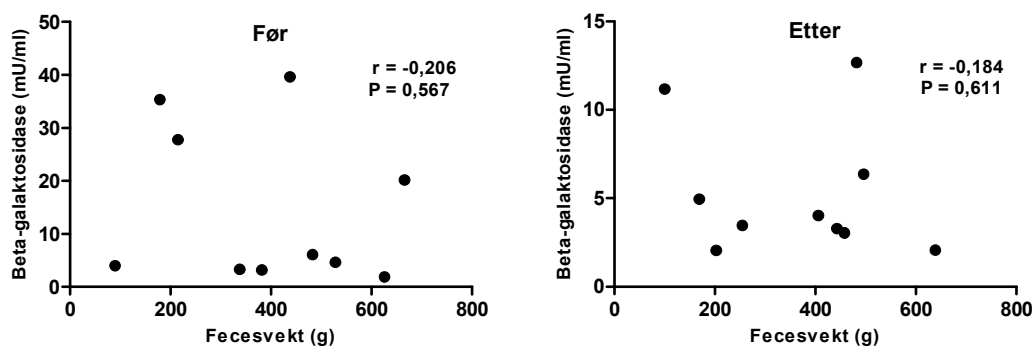
Det var ingen statistisk signifikant korrelasjon mellom ureaseaktivitet målt etter Worthingtonmetoden og ureaseaktivitet målt etter "rapid urease test", verken før eller etter inntak av havregrøt (fig.3.7).



**Figur 3.7** Korrelasjon mellom Worthington ureaseanalyse og "rapid-urease-testen" før (venstre) og etter (høyre) behandling med havregrøt.

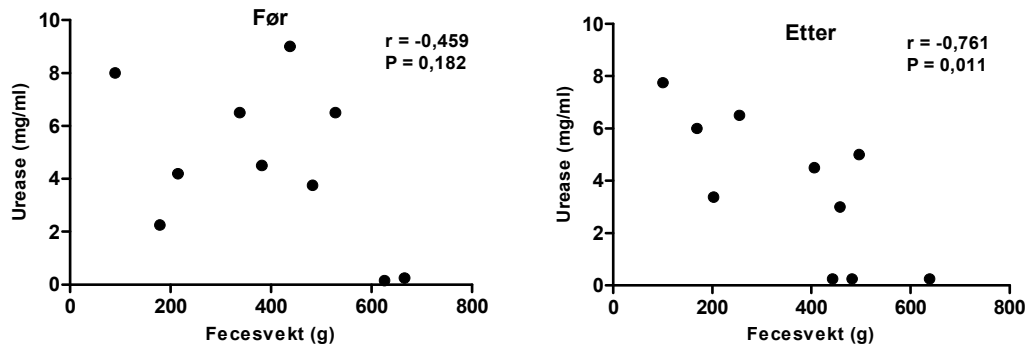
### 3.7 Korrelasjon mellom fecesvekt og enzymaktiviteter

Heller ikke korrelasjonen mellom fecesvekt og beta-galaktosidaseaktiviteten var signifikant, verken før eller etter inntak av havregrøt (fig.3.8).



**Figur 3.8** Korrelasjon mellom beta-galaktosidaseaktivitet og total fecesvekt (3 døgn), før (venstre) og etter (høyre) behandling med havregrøt.

Det var ingen statistisk signifikant korrelasjon mellom fecesvekt og ureaseaktivitet målt med Worthingtonmetoden (resultater ikke vist), eller mellom fecesvekt og ureaseaktivitet målt med "rapid urease test" før behandling med havregrøt (fig. 3.9, venstre del). Det ble likevel påvist en invers korrelasjon (Pearsons  $r = -0.761$ ) mellom fecesvekt og ureaseaktivitet målt med "rapid urease test" etter behandling med havregrøt, og denne var statistisk signifikant ( $P = 0.011$ ) (fig. 3.9, høyre del).



**Figur 3.9** Korrelasjon mellom ureaseaktivitet ("rapid-urease-test") og total fecesvekt (3 døgn), før (venstre) og etter (høyre) behandling med havregrot.

## 4 Diskusjon

Denne studien viser at inntak av havregrøt kan forandre egenskapen ved bakteriefloraen hos friske forsøkspersoner. Både fekal beta-galaktosidaseaktivitet og ureaseaktivitet (ved bruk av ”rapid-urease-test”), sank etter en ukes behandling med havregrøt. Worthington ureaseanalysen viste derimot ingen signifikant forskjell i ureaseaktivitet før og etter behandling med havregrøt. Det var ingen korrelasjon mellom resultatene fra de to ureaseanalysene.

I det følgende drøftes disse funnenes mulige betydning. Deretter diskuteres svakheter ved metodene som ble benyttet i studien.

### 4.1 Fekal beta-galaktosidaseaktivitet

Studien viste at fekal beta-galaktosidaseaktivitet sank signifikant etter en uke med havregrøtinntak. Denne nedgangen var uventet, og står i motsetning til den oppsatte hypotesen vår om at havregrøt som prebiotikum vil stimulere vekst av gode bakterier som produserer beta-galaktosidase.

Den observerte nedgangen i fekal beta-galaktosidaseaktivitet kan tyde på at vi eventuelt ikke har bruk for beta-galaktosidaseaktivitet i distale deler av tykktarmen når vi spiser havregrøt. Substanser som måles i feces, gir først og fremst et mål på forholdene i distale deler av tykktarmen. Det er tenkelig at behandling med havregrøt induserer endringer i proksimale tykktarm som fører til at de bakterier som produserer beta-galaktosidase i distale tykktarm får mindre næring. Det kan for eksempel tenkes at den proksimale sakkarolytiske aktiviteten økes. Hvis det stemmer, at havregrøt bedrer karbohydratfermenteringen i høyre colonhalvdel, kan dette tenkes å ha konsekvenser for behandlingen av pasienter med irritabel tarm. Mange av disse pasientene kan kanskje ha plager på grunn av en ufullstendig gjæring av uabsorberte, men fermenterbare karbohydrater i proksimale tykktarm, slik at fermenteringen dermed fortsetter også i distale colon (Valeur, Øines et al. 2008). I dyremodeller er det vist at et forhøyet nivå av karbohydratfermenteringprodukter i distale colon kan forårsake overfølsomhet i tykktarmen, såkalt visceral hypersensitivitet (Bourdu, Dapoigny et al. 2005). I tillegg er det observert at mange pasienter med IBS blir verre av å spise uabsorbable, men fermenterbare karbohydrater. Denne form for karbohydratintoleranse kan kanskje forklares ved ufullstendig gjæring (Morken, Nysaeter et al. 2008). Det ville derfor være interessant å sammenligne målingene av beta-galaktosidase i feces (som mål på bakterieaktivitet i distale

tykktarm) med målinger av beta-galaktosidase i cøcum (som mål på bakterieaktivitet i proksimale tykktarm).

Det kan også tenkes at havregrøt fører til andre endringer som kan forklare en nedregulering av beta-galaktosidaseaktiviteten, som vekst av andre bakterier enn bifidobakterier. Bifidobakterier er sannsynligvis den viktigste kilden til beta-galaktosidase (Crittenden 2006), og det kan tenkes at vekst av andre bakterier (som følge av havregrøtinntak) går på bekostning av vekst av bifidobakterier. Det er ikke nødvendigvis snakk om skadelige bakterier, men for eksempel bakterier som produserer andre karbohydratnedbrytende enzymer enn beta-galaktosidase. I sin virkning må vel beta-galaktosidase først og fremst betraktes som et laktosenedbrytende enzym (Jarlsby, Valeur et al. 2008), og er kanskje ikke egnet til å bryte ned de karbohydratene som finnes i havre. En potensiell kandidat i så måte er kanskje alfa-galaktosidase, som synes å ha mer bredspektret substratpreferanse, blant annet med amylase-liknende virkninger. En studie av Di Stefano et al. har vist at alfa-galaktosidase (sukrase-isomaltase og maltase-glukoamylase), reduserte gassproduksjon og symptomer hos friske forsøkspersoner etter et måltid rik på fermenterbare karbohydrater i form av kokte bønner (Di Stefano, Miceli et al. 2007). Siden vi vet at IBS pasienter er spesielt plaget med luft smerter, og at havregrøt tolereres godt av disse pasientene, kunne man tenke seg havregrøt kanskje økte aktiviteten av alfa-galaktosidase i stede for beta-galaktosidase.

At havre kan ha prebiotisk effekt på andre bakterier enn bifidobakterier, støttes også av en in vitro-studie av Crittenden et al. (Crittenden, Karppinen et al. 2002). Denne viste at beta-glukan kunne fermenteres av bacteroidetes og clostridia, men ikke av verken bifidobakterier eller lactobacilli. Dette kan kanskje forklare hvorfor behandling med havregrøt i min studie ikke gav noen økning i beta-galaktosidaseaktiviteten. En annen studie (Crittenden 2006), viste at bifidobakterier likevel kan benytte seg av oligosakkarider som dannes gjennom hydrolyse av beta-glukan.

## 4.2 Fecal ureaseaktivitet

Etter den oppsatte hypotesen skulle fekal ureaseaktivitet senkes etter 1 uke med havregrøt. Dette ble bare delvis bekreftet. Mens rapid-urease-testen viste en signifikant nedgang i ureaseaktivitet i prøvene før og etter inntak av havregrøt, viste Worthingtin analyse ingen signifikant forskjell, selv om ureaseaktiviteten også her antydningvis gikk ned etter 1 uke med havregrøt. Til tross for mulige feilkilder (se senere), viste begge analysene en tendens til at ureasekonsentrasjonen går ned etter en uke med havregrøt, hvilket kan tyde på at havregrøt

ikke gir næring til de dårlige, urease produserende bakteriene. Det viste seg dessuten at havregrøt hadde større virkning på nedgang av ureaseaktiviteten, enn på beta-galaktosidaseaktiviteten. Ureaseproduserende bakterier trives best ved høy pH, og oppvekst av de gode bakteriene fremmes ved lav pH. Hvis man går ut fra at havregrøt øker karbohydratfermenteringen i colon, kan man tenke seg at pH verdien senkes og dermed gir et bra miljø for de gode bakteriene. Dette kan være forklaringen på at de dårlige bakteriene fortrenses. Vi vet at bakteriene i tarmen konkurrerer mot hverandre, så det er derfor tenkelig at inntak av havregrøt kan ha økt andre typer bakteriepopulasjoner enn urease- og beta-galaktosidase-produserende stammer.

### **4.3 Korrelasjon mellom de to ureaseanalysene**

Jeg fant dessverre ingen korrelasjon mellom de to ureaseanalysene. Dette kan skyldes feilkilder ved utføringen av begge analysene (se 4.3). Det sannsynligvis viktigste forhold å peke på er at de 3 siste målingene med Worthingtonanalysen skilte seg sterkt fra de øvrige resultatene ved denne metoden, trolig fordi målingene ble utført på forskjellige dager med bruk av ulike standarder. Jeg tror at dette kan ha påvirket korrelasjonen mellom de to analysene, og det ville være relevant å få gjort nye målinger ved et senere tidspunkt, med bruk av samme standard.

### **4.4 Svakheter ved metodene**

#### **4.4.1 Forhold ved forsøkspersonene og forsøksdesignet:**

Miljøet ved Haukeland Universitetssykehus og Universitet i Bergen ble valgt for å rekruttere forsøkspersonene til dette prosjektet, fordi man hadde håpet å få mest respons fra dette miljøet. Det var mest studenter rundt 20 år som meldte seg frivillig til å delta. For å finne ut om deltakerne var friske, og for å utelukke IBS, valgte jeg å ”screene” dem med Roma II-kort skjema. Fordelen med dette skjemaet er at man på en veldig rask og enkelt måte kan finne ut om deltakerne er fri fra mage- og tarmplager. Feilkilden ligger i at man ikke kan kontrollere om alle deltakerne har svart korrekt og sannferdig på spørsmålene. Selv om de oppga å være friske, ble ingen ytterligere undersøkelser foretatt. Man kan tenke seg at noen av forsøkspersonene nok hadde mageplager likevel, og kanskje stilte opp på forsøket fordi de ville finne ut mer om dette, og til og med få betalt for det (deltakelse i denne studien ble kompensert med 1000 kr). Det er kjent at en del personer med IBS aldri oppsøker lege (såkalte ”non-consulters”) (Ringström, Abrahamsson et al. 2007), og slike personer er trolig

mer motivert for deltakelse i en studie som denne enn helt friske personer. Dette kan ha påvirket resultatene mine, ved at bakteriefloraen kan tenkes å være annerledes hos en person med mage- og tarm problemer (der dårlige bakterier kan tenkes å være dominerende). Dette er en mulig forklaring på hvorfor noen av forsøkspersonene hadde en lav beta-galaktosidaseaktivitet før havregrøtbehandling.

Jeg opplevde at det var vanskelig å skaffe forsøkspersoner som var villig til å samle inn avføring, og jeg valgte derfor to innsamlingsperioder på 3 døgn, og havregrøtbehandling en gang om dagen i 1 uke. Dette kan ha vært for kort og for lite. Grunn for valget som ble tatt, var først og fremst for å unngå at deltakerne ville begynne å trekke seg under forsøket (minimalisere ”compliance”, etterlevelse).

Ikke alle forsøkspersoner leverte en fecesboks for hvert døgn, og noen av dem viste tydelig tegn til forstoppelse, bedømt utfra feceskonsistens. Fecesvekten økte ikke under forsøket, og slik sett kan det tenkes at dosen av havregrøt kan ha vært for liten til å gi full effekt på enzymaktivitetene. Bortsett fra å unngå å spise havre i en periode før forsøket og beskjed om å spise havregrøt daglig under forsøket, skulle ikke forsøkspersonene følge noen bestemt kostholdsplan. Det kan derfor tenkes at andre næringsmidler inntatt under forsøksperioden kan ha påvirket bakteriefloraen, for eksempel inntak av probiotika og prebiotika. Dette kan tenkes å ha påvirket enzymaktivitetene både før og etter havregrøtbehandling.

#### **4.4.2 Forhold ved bearbeiding og analysene av fecesprøvene:**

Jeg fant begrenset litteratur om de aktuelle enzymanalysene, og studien var til dels lagt opp som en metodeutprøving. Siden jeg ikke brukte etablerte og velutprøvde metoder, var arbeidet med å finne riktige standarder og riktige homogeniseringsmåter krevende. Dette kan også ha gitt opphav til en rekke feilkilder:

##### 1) Oppbevaring av fecesprøvene og homogeniseringsprosessen.

Det er kjent at enzymreaksjoner generelt sett skjer best ved høye temperaturer. Det var derfor viktig at fecesprøvene rask måtte fryses ned og holdes nedkjølt ved -20 grader frem til analysering, for å forhindre at beta-galaktosidase eller urease aktiviteten ble falsk forhøyet. Det viste seg at den målte enzymaktiviteten sank etter gjentatt tining og frysing. Fecesprøvene kan ha blitt utsatt for varme under innsamlingen, og dermed gitt høyere verdier for både beta-galaktosidase- og ureaseaktivitet. Tiden fra innsamling til avlevering av fecesprøvene kan ha avbrutt kjølekjeden, likeledes homogeniseringsprosessen og analysetidspunktet, der prøvene ble tint opp gjentatte ganger (homogeniseringen og de tre analysene ble utført på forskjellige

dager). De målte enzymaktivitetene kan ha endret seg av disse grunner. Det er likevel lite trolig at dette kan forklare endringene vi observerte i målingene før og etter havregrøtbehandling, fordi alle før-prøvene ble behandlet på akkurat samme måte som alle etter-prøvene.

## 2) Analyseprosessen.

Små mengder av de forskjellige løsninger måtte pipetteres. Det var viktig med en nøyaktig og riktig pipettering, som ikke alltid var like lett. Noen av fecesprøvene inneholdt mye fiberrester som blokkerte pipetten eller hadde satt seg fast i veggene til pipetten, selv etter flere homogeniseringer. Mengden pipettert fecessuspensjon i brønnplatene kunne derfor variere noe, og dette kan ha gitt analyseavvik.

At ikke alle fecesprøvene ble analysert på samme dag, og det kan spesielt ha gått ut over de siste 3 prøveresultatene med Worthington ureaseanalysen, som viste spesielt høye verdier i ureaseaktiviteten, både før og etter havregrøtbehandlingen. Det ble her benyttet en annen standard enn ved de tidligere målingene, og selv om oppskriften var den samme, vil det alltid være små variasjoner mellom to ulike løsninger. Dette har ført til at standardkurven hos de siste 3 prøvene var forskjellig fra standardkurven til de første 7 analyserte prøvene, og dette har nok påvirket resultatene. Man kan tenke seg at dette er grunnen til at ureaseaktiviteten ikke var signifikant forskjellig før og etter inntak med havregrøt ved Worthingtonmetoden, mens den var det med ”rapid urease test”-metoden.

”Rapid-urease-testen” blir vanligvis brukt for å påvise urease i ventrikelbiopsier, og ikke for å måle ureaseaktivitet i fecesprøver. Uten tilstrekkelig metodeutprøving er det vanskelig å si om denne metoden er brukbar for å måle fekal ureaseaktivitet. Det er med denne metoden dessuten vanskelig å angi eksakt tidspunkt for fargeomslag til mangenta rød, fordi dette foregår visuelt (”med det blotte øye”) og dermed mindre objektivt enn ved maskinell registrering. Det var også vanskelig å avlese ureasekonsentrasjonen ut fra den standardkurven som vi hadde tilgjengelig (se vedlegg 7). Dette kan ha ført til at ureaseaktiviteten ved noen av prøvene ble avlest for lavt eller for høyt.

## **4.5 Konklusjon**

Denne pilotstudien viste at behandling med havregrøt i en uke kan forandre egenskaper knyttet til bakteriefloraen vår, målt som redusert bakteriell beta-galaktosidase- og ureaseaktivitet. At beta-galaktosidaseaktiviteten synker kan kanskje forklares ved at denne



funksjonen ikke behøves når vi spiser havregrøt. At ureaseaktiviteten synker kan kanskje forklares ved at inntak av havregrøt gir vekst av mikrober som fortrenger bakterier med potensielt helseskadelige virkninger. Om havregrøt utfra dette kan betraktes som et prebiotikum er likevel fortsatt uvisst, siden prebiotika defineres ufra deres evne til å stimulere vekst av bakterier med helsefremmende effekter, noe vi ikke direkte kunne påvise i dette forsøket. Resultatene tyder likevel på at det bør forskes mer spesifikt på denne problemstillingen i fremtiden.

Denne studien var eksplorativ, og hadde til hensikt å teste om det i det hele tatt gikk an å påvirke tarmfloraen ved inntak av havregrøt, og om metodene som ble brukt kunne egne seg til å analysere enzymaktivitet i fecesprøver. Resultatene fra denne studien bør konsolideres, i større skala, både med hensyn til antall deltakere og varighet av havregrøtbehandlingen. Videre bør egenskapene til metodene for å analysere fekal enzymaktivitet karakteriseres bedre. Det er også av interesse å finne ut om inntak av havregrøt eventuelt påvirker andre bakteriepopulasjoner og enzymaktiviteter, blant annet er det gode grunner til å bestemme fekal alfa-galaktosidaseaktivitet. En behandling av irritabel tarm er vanskelig og de få medikamentene vi har til rådighet er dyre å bruke. Det vil derfor være interessant å teste om behandling med havregrøt kan påvirke bakteriefloraen til slike pasienter i gunstig retning, og se om denne endringen kan gi symptomatisk bedring.

## 5 Referanser

Aller, R., D. A. de Luis, et al. (2004). "Effects of a high-fiber diet on symptoms of irritable bowel syndrome: a randomized clinical trial." Nutrition **20**(9): 735-7.

Andersen, K. J., Schjønby, H. and D. W. Skagen (1983). "Enzyme activities in human and rat jejunal mucosa." Scand J Gastroenterol **18**: 241-249.

Bazzocchi, G., P. Gionchetti, et al. (2002). "Intestinal microflora and oral bacteriotherapy in irritable bowel syndrome." Dig Liver Dis **34**: S48-53.

Besselink, M. G. H., H. C. van Santvoort, et al. (2008). "Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." The Lancet **371**: 651-659.

Biesalski, H. K. (2000, 4.12.2007). "Ballaststoffe." Wissenschaftliche Ernährungsinformation, 2000, from [http://www.kelloggs.de/ernaehrungsforum/fachkraefte/PDF/1060\\_Ballaststoffe.pdf](http://www.kelloggs.de/ernaehrungsforum/fachkraefte/PDF/1060_Ballaststoffe.pdf).

Biesalski, H. K. (2000). "Wissenschaftliche Ernährungsinformation, Ballaststoffe." Forum Ernährungsmedizin: 3-34.

Biesalski, H. K. (2004). Ballaststoffe. Ernährungsmedizin. H. K. Biesalski, P. Fürst, H. Kasperet al. Stuttgart, Thieme: 69-73.

Biesalski, H. K. and P. Grimm (2002). Taschenatlas der Ernährung. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Bjarnason, I. and A. Bjarnason (2005). "Unorthodox treatment for irritable bowel syndrome?" Eur J Gastroenterol Hepatol **17**(1): 1-3.

Bjørneboe, G.-E. and A. Aarsland (2005). Karbohydrater. Mat og medisn. G.-E. Bjørneboe and C. A. Drevon. Kristiansand, Høyskoleforlaget AS: 119-125.

Blachier, F., F. Mariotti, et al. (2007). "Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences." Amino Acids **33**(4): 547-62.

Bourdu, S., M. Dapoigny, et al. (2005). "Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of noninflammatory colonic hypersensitivity in rats." Gastroenterology **128**(7): 1996-2008.

Bullock, N. R. and M. R. Jones (2006). Dietary intervention for improving human health: Chronic disorders. Prebiotics - Development & Application. G. R. Gibson and R. A. Rastall. England, Wiley: 181-199.

Bunzel, M. and H. Steinhart (2003). "Kein Ballst in der Nahrung... Strukturmerkmale von Ballaststoffkomponenten." Chem. Unsere Zeit **37**: 188-196.

Bunzel, M. and H. Steinhart (2003). "Kein Ballst in der Nahrung... Strukturmerkmale von Ballaststoffkomponenten." Chem. Unsere Zeit **37**: 188-196.

Burne, R. A. and Y. Y. Chen (2000). "Bacterial ureases in infectious diseases." Microbes Infect **2**(5): 533-542.

Casci, T. and R. A. Rastall (2006). Manufacture of prebiotic: Oligosaccharides. Prebiotica: Development and Application. G. R. Gibson and R. A. Rastall. Chichester, England, John Wiley & Sons, Ltd: 29-55.

Chang, R. (2006). General chemistry: The essential concept. New York, Mc Graw Hill higher companies.

Collins, C. M. and S. E. D'Orazio (1993). "Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis." Mol Microbiol **9**(5): 907-13.

Crittenden, R. (2006). Emerging prebiotic carbohydrates. Prebiotics - Development and application. G. R. Gibson and R. A. Rastall. Weinheim, Germany, John Wiley & Sons, Ltd: 111-133.

Crittenden, R., S. Karpainen, et al. (2002). "In vitro fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria." Journal of the Science of Food and Agriculture **82**: 1-9.

de Vrese, M. and P. R. Marteau (2007). "Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea." The Journal of Nutrition **137**(3 Suppl 2): 803-811.

de Vrese, M. and J. Schrezenmeir (2008). "Probiotics, prebiotics, and synbiotics." Adv Biochem Eng Biotechnol **111**: 1-66.

Di Stefano, M., E. Miceli, et al. (2007). "The effect of oral alpha-galactosidase on intestinal gas production and gas-related symptoms." Dig Dis Sci **52**(1): 78-83.

Estrada, A., C. H. Yun, et al. (1997). "Immunomodulatory activities of oat beta-glucan in vitro and in vivo." Microbiol Immunol **41**(12): 991-998.

Favier, C., C. Neut, et al. (1997). "Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease." Dig Dis Sci **42**(4): 817-822.

Florent, C., B. Flourie, et al. (1985). "Influence of chronic lactulose ingestion on the colonic metabolism of lactulose in man (an in vivo study)." J Clin Invest **75**(2): 608-13.

Ford, A. C., N. J. Talley, et al. (2008). "Effect of fibre, antispasmodics, and peppermint oil in the treatment of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis." BMJ **337**: a2313.

Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid (1995). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics." J Nutr **125**(6): 1401-12.

Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid (1995). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics." J Nutr **125**(6): 1401-1412.

Guarner, F. and J. R. Malagelada (2003). "Gut flora in health and disease." Lancet **361**(9356): 512-9.

Harder, H., J. Serra, et al. (2003). "Intestinal gas distribution determines abdominal symptoms." Gut **52**(12): 1708-13.

He, T., K. Venema, et al. (2008). "The role of colonic metabolism in lactose intolerance." Eur J Clin Invest **38**(8): 541-7.

Holzappel, W. H., P. Haberer, et al. (1998). "Overview of gut flora and probiotics." Int J Food Microbiol **41**(2): 85-101.

Huth, K. and B. M. Büdingen (2004). Ballaststoffe: Chemie - physiologische Wirkungen - gesundheitlicher Wert - Ballaststoffzufuhr und Kostpläne. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

Jarlsby, R., J. Valeur, et al. (2008). Laktosemalabsorpsjon - en fordel? Norsk tidsskrift for Ernæring. **4**: 10-13.

Kane, S. V., W. J. Sandborn, et al. (2003). "Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation." Am J Gastroenterol **98**(6): 1309-14.

Kasper, H. and W. Scheppach (2004). Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes. Ernährungsmedizin. H. K. Biesalski, P. Fürst, H. Kasper et al. Stuttgart, Thieme: 361.

Kässinen, A., L. Krogius-Kurikka, et al. (2007). "The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects." Gastroenterology **133**(1): 24-33.

Ley, R. E., P. J. Turnbaugh, et al. (2006). "Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity." Nature **444**(7122): 1022-1023.

Lin, H. C. (2004). "Small intestinal bacterial overgrowth: a framework for understanding irritable bowel syndrome." JAMA **292**(7): 852-8.

Lupton, J. R. and P. R. Trumbo (2006). Dietary fiber. Modern Nutrition in health and disease. M. E. Shils, M. Shike, A. C. Ross, B. Caballero and R. J. Cousins. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins: 83-91.

Mark Pimentel, M. (2006). A new IBS solution. California, Health Point Press.

Mobley, H. L., M. D. Island, et al. (1995). "Molecular biology of microbial ureases." Microbiol Rev **59**(3): 451-480.

Morken, M. H., G. Nysaeter, et al. (2008). "Lactulose breath test results in patients with persistent abdominal symptoms following Giardia lamblia infection." Scand J Gastroenterol **43**(2): 141-5.

Müller-Lissner, S. (2005). "Ballast abwerfen." Gastroenterology **53**: 229-230.

O'Hara, A. M. and F. Shanahan (2006). "The gut flora as a forgotten organ." EMBO Rep **7**(7): 688-93.

Olivera-Severo, D., G. E. Wassermann, et al. (2006). "Ureases display biological effects independent of enzymatic activity: is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria?" Braz J Med Biol Res **39**(7): 851-61.

Parkes, G. C., J. Brostoff, et al. (2008). "Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: their role in its pathogenesis and treatment." Am J Gastroenterol **103**(6): 1557-67.

Pimentel, M. (2006). A new IBS solution. California, Health Point Press.

Quigley, E. M. (2007). "Bacterial flora in irritable bowel syndrome: role in pathophysiology, implications for management." J Dig Dis **8**(1): 2-7.

R. Jarlsby, J. Valeur, et al. (2008). Laktosemalabsorpsjon - e fordel? Norsk tidsskrift for Ernæring. **4**: 10-13.

Rao, A. V. (1999). "Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects." J Nutr **129**(7 Suppl): 1442S-5S.

Rastall, R. A. (2006). Galacto-oligosaccharides as prebiotic food ingredients. Prebiotics: Development and Application. G. R. Gibson and R. A. Rastall. Chichester, England, John Wiley & Sons, Ltd: 102-133.

Ringström, G., H. Abrahamsson, et al. (2007). "Why do subjects with irritable bowel syndrome seek health care for their symptoms?" Scand J Gastroenterol **42**(10): 1194-203.

Sadiq Butt, M., M. Tahir-Nadeem, et al. (2008). "Oat: unique among the cereals." Eur J Nutr **47**(2): 68-79.

Scheck, A. (2002). Ballaststoffe. Ernährungslehre kompakt. Giessen, Germany, Umschau Zeitschriftenverlag: 81-84.

Valeur, J. and A. Berstad (2008). "Hvorfor har vi tykktarm." Tidsskrift for den norske legeforening **11**: 1298-1300.

Valeur, J., E. Øines, et al. (2008). "Plasma glucagon-like peptide 1 and peptide YY levels are not altered in symptomatic fructose-sorbitol malabsorption." Scand J Gastroenterol **43**: 1212-18.

Vernazza, C. L., B. A. Rabiou, et al. (2006). Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: Introduction to prebiotics. Prebiotics development & application. G. R. Gibson and R. A. Rastall. England, John Wiley & Sons, Ltd: 1-28.

Worthington, b. c. (2009, 15.02.2009). "Urease assay." from <http://www.worthington-biochem.com/URC/assay.html>.

Ytrebø, L. M. (2007). "Forstyrrelser i ammoniakkmetabolismen." Tidsskrift for den norske legeforening **11**: 1514-1517.

## 6 Vedlegg

Vedlegg 1: Godkjenning fra REK

Vedlegg 2: Godkjenning fra NSD

Vedlegg 3: Roma II (kortversjon)

Vedlegg 4: Dagbok

Vedlegg 5: Prosedyr for innsamling av fecesprøver

Vedlegg 6: Oppskrift for tillaging av fosfatbuffer (PBS) ved ureaseanalysen etter Worthington

Vedlegg 7: Standardkurve for rapid-urease-testen



UNIVERSITETET I BERGEN

Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, Vest-Norge (REK Vest)

Jørgen Valeur  
Institutt for indremedisin  
Universitetet i Bergen  
5020 Bergen

Deres ref	Vår ref	Dato
	2008/2454-ANØL	06.03.2008

**Ad. prosjekt: Effekt av havregrynsgrøt på tykktarmsmetabolisme hos friske forsøkspersoner (030.08).**

Det vises til din søknad om godkjenning av forskningsprosjekt, datert 12.02.08.

Komiteen behandlet søknaden i møte den 28.02.08.

De regionale komiteene for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk foretar sin forskningsetiske vurdering med hjemmel i Forskningsetikklovens § 4. Saksbehandlingen følger Forvaltningsloven.


Komiteen mener dette er en uproblematisk studie.

Det aksepteres at deltakerne kompenseres med 1000 kroner for merarbeidet deltakelse medfører. En har merket seg at en rekrutterer deltakere ved egen avdeling. Dette kan være uheldig sett i et frivillighetsperspektiv og det må gjøres helt klart at deltakelse er frivillig. Her anbefaler komiteen å rekruttere via oppslag og unngå direkte forespørsel.

Vedtak:

*Prosjektet godkjennes i samsvar med forelagt søknad.*

Vennlig hilsen

  
Jon Lekven  
leder

  
Anne Berit Ølmheim  
førstekonsulent

Postadresse  
Postboks 7804  
5020 Bergen

rek-vest@uib.no  
www.etikkom.no/REK  
Org no. 874 789 542

Regional komité for medisinsk  
og helsefaglig forskningsetikk,  
Vest-Norge  
Telefon 55 97 84 97 / 98 / 99

Besøksadresse  
Haukeland Universitetssykehus

**Norsk samfunnsvitenskapelig datatjeneste AS**  
NORWEGIAN SOCIAL SCIENCE DATA SERVICES



Harald Hårfagres gate 29  
N-5007 Bergen  
Norway  
Tel: +47-55 58 21 17  
Fax: +47-55 58 96 50  
nsd@nsd.uib.no  
www.nsd.uib.no  
Org.nr. 985 321 884

Jørgen Valeur  
Institutt for indremedisin  
Universitetet i Bergen  
Haukeland Universitetssykehus  
5021 BERGEN

Vår dato: 07.04.2008

Vår ref: 18685 / 2 / SF

Deres dato:

Deres ref:

## TILRÅDING AV BEHANDLING AV PERSONOPPLYSNINGER

Vi viser til melding om behandling av personopplysninger, mottatt 14.02.2008. Meldingen gjelder prosjektet:

18685	<i>Effekt av havregrynsgrot på tykktarmsmetabolisme hos friske forsøkspersoner</i>
Behandlingsansvarlig	<i>Universitetet i Bergen, ved institusjonens øverste leder</i>
Daglig ansvarlig	<i>Jørgen Valeur</i>
Student	<i>Nathalie Puaschitz</i>

Personvernombudet har vurdert prosjektet, og finner at behandlingen av personopplysninger vil være regulert av § 7-27 i personopplysningsforskriften. Personvernombudet tilrår at prosjektet gjennomføres.

Personvernombudets tilråding forutsetter at prosjektet gjennomføres i tråd med opplysningene gitt i meldeskjemaet, korrespondanse med ombudet, eventuelle kommentarer samt personopplysningsloven/-helseregisterloven med forskrifter. Behandlingen av personopplysninger kan settes i gang.

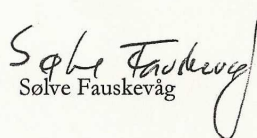
Det gjøres oppmerksom på at det skal gis ny melding dersom behandlingen endres i forhold til de opplysninger som ligger til grunn for personvernombudets vurdering. Endringsmeldinger gis via et eget skjema, [http://www.nsd.uib.no/personvern/forsk\\_stud/skjema.html](http://www.nsd.uib.no/personvern/forsk_stud/skjema.html). Det skal også gis melding etter tre år dersom prosjektet fortsatt pågår. Meldinger skal skje skriftlig til ombudet.

Personvernombudet har lagt ut opplysninger om prosjektet i en offentlig database, <http://www.nsd.uib.no/personvern/prosjektoversikt.jsp>.

Personvernombudet vil ved prosjektets avslutning, 31.12.2010, rette en henvendelse angående status for behandlingen av personopplysninger.

Vennlig hilsen

  
Bjørn Henrichsen

  
Sølve Fauskevåg

Kontaktperson: Sølve Fauskevåg tlf: 55 58 25 83  
Vedlegg: Prosjektvurdering  
Kopi: Nathalie Puaschitz, Fredlundsvingen 26, 5073 BERGEN

Avdelingskontorer / District Offices:

OSLO: NSD, Universitetet i Oslo, Postboks 1055 Blindern, 0316 Oslo. Tel: +47-22 85 52 11. nsd@uio.no  
TRONDHEIM: NSD, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet, 7491 Trondheim. Tel: +47-73 59 19 07. kyrre.svarva@svt.ntnu.no  
TROMSØ: NSD, SVF, Universitetet i Tromsø, 9037 Tromsø. Tel: +47-77 64 43 36. nsdmaa@sv.uit.no



## SPØRRESKJEMA FOR PASIENT

Vedlegg 3

FYLT UT DATO: .....

NAVN: ..... FØDSELSNR: .....

## 1. IBS-KRITERIER

(Sett ring rundt svaret)

Spørsmål	Svar	
	Ja	Nei
1.1 Har du vært plaget av smerter eller ubehag i magen de siste 3 måneder?	Ja	Nei
1.2 Har du kjent disse plagene minst 1 dag/uke i 3 uker eller mer, i løpet av siste 3 måneder?	Ja	Nei
1.3 Er avføringen uregelmessig?	Ja	Nei
1.4 Har du mye luft i magen?	Ja	Nei
1.5 Blir smertene/ubehaget i magen bedre etter at du har hatt avføring/fått tømt deg?	Ja	Nei

## 2. IBS KRITERIER SOM GIR STØTTE FOR DIAGNOSEN

(Sett ring rundt svaret)

Spørsmål	Svar	
	Ja	Nei
2.1 Hvis du har diaré, hender det at avføringen er fast inn i mellom?	Ja	Nei
2.2 Hvis du har forstoppelse, hender det at avføringen er løs inn i mellom?	Ja	Nei
2.3 Har du avføring om natta?	Ja	Nei
2.4 Hva har du mest av?	Diaré	
	Forstoppelse	

## 3. KVANTITERING AV IBS SYMPTOMER

Angis på en skala fra 0 til 10, der 0 = ingen symptomer og 10 = alvorlige symptomer (*Kane, Am J Gastroenterol 2003*)

(Angi med tall fra 0 til 10)

Spørsmål	Svar
3.1 Kvalme	
3.2 Oppblåsthet	
3.3 Magesmerter	
3.4 Forstoppelse	

3.5 Diaré	
3.6 Anoreksi (ulyst på mat)	

4. *SYMPTOMER SOM KREVER NÆRMERE VURDERING* (Sett ring rundt svaret)

Spørsmål	Svar	
4.1 Har du gått ned i vekt det siste året?	Ja	Nei
4.2 Har du sett blod i avføringen?	Ja	Nei
4.3 Har du brukt antibiotika det siste året?	Ja	Nei
4.4 Er det noen i din nærmeste familie som har eller har hatt kreft i tykktarmen? (Som nærmeste familie menes foreldre, søsken og barn.)	Ja	Nei

5. *FUNKSJONELL DYSPEPSI* (Sett ring rundt svaret)

Spørsmål	Svar	
5.1 Har du hatt smerter eller ubehag ovenfor navlen?	Ja	Nei
5.2 Har du kjent disse plagene høyt oppe i magen minst 1 dag/uke i 3 uker eller mer, i løpet av de siste 3 måneder?	Ja	Nei
5.3 Blir smertene/ubehaget i øvre del av magen bedre etter at du har hatt avføring?	Ja	Nei

6. *HALSBRANN* (Sett ring rundt svaret)

Spørsmål	Svar	
6.1 Har du hatt halsbrann eller sviende/brennende smerte bak brystbenet?	Ja	Nei
6.2 Har du kjent disse plagene minst 1 dag/uke i 3 uker eller mer, i løpet av de siste 3 måneder?	Ja	Nei

7. *TILLEGGSPØRSMÅL FOR Å KARAKTERISERE ALLE PASIENTENE*

(Sett ring rundt svaret)

Spørsmål	Svar	
7.1 Har du hatt mageplagene lenger enn ett år?	Ja	Nei
7.2 Har du oppsøkt lege for slike mageplager tidligere?	Ja	Nei
7.3 Mener du at stress eller psykiske faktorer betyr noe for plagene dine?	Ja	Nei
7.4 Er du engstelig for om plagene kan skyldes kreft eller annen alvorlig sykdom?	Ja	Nei

**Registreringsskjema: Behandling med havregrøt****Uke 1**

Vennligst kryss av for gjennomført behandling.  
Hvis behandlingen er utelatt: Vennligst oppgi årsaken til dette i kommentarfeltet

**Mandag**

Spist havregrøt   
Ikke spist havregrøt  (Vennligst begrunn dette i kommentarfeltet)

Kommentar: \_\_\_\_\_

**Tirsdag**

Spist havregrøt   
Ikke spist havregrøt  (Vennligst begrunn dette i kommentarfeltet)

Kommentar: \_\_\_\_\_

**Onsdag**

Spist havregrøt   
Ikke spist havregrøt  (Vennligst begrunn dette i kommentarfeltet)

Kommentar: \_\_\_\_\_

**Torsdag**

Spist havregrøt   
Ikke spist havregrøt  (Vennligst begrunn dette i kommentarfeltet)

Kommentar: \_\_\_\_\_

**Fredag**

Spist havregrøt   
Ikke spist havregrøt  (Vennligst begrunn dette i kommentarfeltet)

Kommentar: \_\_\_\_\_

**Lørdag**

Spist havregrøt   
Ikke spist havregrøt  (Vennligst begrunn dette i kommentarfeltet)

Kommentar: \_\_\_\_\_

**Søndag**

Spist havregrøt   
Ikke spist havregrøt  (Vennligst begrunn dette i kommentarfeltet)

Kommentar: \_\_\_\_\_

### **Prosedyre for samling av avføring**

**Avføring skal samles i løpet av 3 døgn.  
Avføringen samles i spesielt egnede bokser, som vil utdeles.  
Du får med deg tre bokser, og du bruker en boks hver dag.  
Unngå å få toalettpapir ned i boksen.**

**Boksene må oppbevares i fryseboks, og bør fryses ned så raskt som mulig. Vi kan låne ut en kjølebag hvis det er behov for dette.**

**Vi vil merke boksene med et nummer, men det er viktig at du setter DATO på boksene (ikke på lokket).**

**Det er viktig at du samler all avføring som kommer i løpet av 3 påfølgende døgn, og at DATO står tydelig skrevet på de boksene du leverer inn.**

**Boksene med avføring tas med til sykehuset når du kommer til pustep prøven.**

**Lykke til!**

**Beste hilsen**

**Nathalie Puaschitz**

## phosphate buffer

Information from cshprotocols.org: Gomori buffers, the most commonly used phosphate buffers, consist of a mixture of monobasic dihydrogen phosphate and dibasic monohydrogen phosphate. By varying the amount of each salt, a range of buffers can be prepared that buffer well between pH 5.8 and pH 8.0 (please see the tables below). Phosphates have a very high buffering capacity and are highly soluble in water. However, they have a number of potential disadvantages:

\* Phosphates inhibit many enzymatic reactions and procedures that are the foundation of molecular cloning, including cleavage of DNA by many restriction enzymes, ligation of DNA, and bacterial transformation.

\* Because phosphates precipitate in ethanol, it is not possible to precipitate DNA and RNA from buffers that contain significant quantities of phosphate ions.

\* Phosphates sequester divalent cations such as  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ .

0.5L of 1M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  at  $174.18\text{g mol}^{-1} = 87.09\text{g}$  dvs. 43,55 g/250 ml vann

0.5L of 1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  at  $136.09\text{g mol}^{-1} = 68.045\text{g}$  dvs. 34,02 g/250 ml vann

preparation of 0.1 M potassium phosphate buffer at 25°C

### Preparation of 0.1 M Potassium Phosphate Buffer at 25°C

pH	VOLUME OF 1 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (ml)	VOLUME OF 1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (ml)
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94.0	6.0

Dilute the combined 1 M stock solutions to 1 liter with distilled  $\text{H}_2\text{O}$ . pH is calculated according to the Henderson-Hasselbalch equation:

$$\text{pH} = \text{pK}' + \log \left\{ \frac{\text{(proton acceptor)}}{\text{(proton donor)}} \right\}$$

where  $\text{pK}' = 6.86$  at 25°C.

# Urease activity by Phenol Red method

