

BACHELOROPPGAVE

BACHELOROPPGAVENS TITTEL	DATO
Global metabolomikk som verktøy for påvisning av biomarkører	26.05.23
	ANTALL SIDER / BILAG
	90/12
FORFATTERE	INTERN VEILEDER
Nurtene Dernjani og Maria Thuy Kieu Thi Nguyen	Per Ola Rønning

UTFØRT I SAMMARBEID MED	EKSTERN VEILEDER
Rikshospitalet, Avdeling for medisinsk biokjemi, Klinikk for laboratoriemedisin, Oslo universitetssykehus	Katja B. Prestø Elgstøen og Sander Guttorm

SAMMENDRAG
<p>Formålet med denne oppgaven var å påvise potensielle biomarkører knyttet til trening. Utgangspunktet for metoden var en allerede etablert LC-MS/MS-metode til analyse av metabolomet, samt prøveopparbeiding av «Dried Blood Spot». Målet var å detektere metabolske endringer knyttet til trening.</p> <p>En gruppe med fem deltakere gjennomførte en høyintensiv treningsøkt for å påvise de metabolske endringer som oppstår i kroppen under trening. For å sikre at eventuelle forskjeller skyldes trening og minimere variasjoner som kan oppstå på grunn av ulikheter i kostholdet, fulgte alle forsøkspersonene en identisk diett.</p> <p>Fleire metabolitter ble påvist som potensielle biomarkører. Blant annet ble hypoxantin, melkesyre, taurin og fenylalanin funnet å være økt i prøver rett etter trening, mens adenosin-5'-monofosfat viste en reduksjon. I tillegg ble også Lac-Phe detektert i noen av prøvene. Lac-Phe er en nylig påvist biomarkør for trening. Det ble også påvist én ukjent forbindelse med to «features» som viste en kraftig økning rett etter trening, med etterfølgende rask reduksjon tilbake til utgangspunktet. Den ukjente forbindelsen kan muligens være en biokjemisk signatur for treningsmetabolomet.</p>

3 STIKKORD
Global metabolomikk
Dried Blood Spot
LC-MS/MS

FORORD

Denne oppgaven er levert som bacheloroppgave for ingeniørutdanning Bioteknologi og kjemi ved Oslo Metropolitan University. Oppgaven er utført ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Klinikk for laboratoriemedisin, Oslo Universitetssykehus – Rikshospitalet i tidsperioden januar til mai 2023. Faglig veiledere ved Rikshospitalet var forsker Katja B. Prestø Elgstøen og spesialingeniør Sander Guttorm. Intern veileder ved Oslo Metropolitan University var førsteamanuensis Per Ola Rønning.

Først og fremst vil vi gi en stor takk til alle på Avdeling for medisinsk biokjemi for god hjelp, utmerket veiledning og vennlig mottagelse.

Tusen takk til alle som har tatt seg tid til å delta i dette forsøket og gitt super innsats, og en spesiell takk til overlege Helge Rootwelt for sine gode innspill og hans smittende humor. Vi vil også takke Elise M. Sandås og Hanne B. Skogvold som har kommet med verdifulle tilbakemeldinger på våre spørsmål.

En stor takk går til Per Ola Rønning, som har bidratt med både oppmuntrende og inspirerende veiledning, konstruktive innspill og hans engasjement.

Vi vil også rette en stor takk til Katja, for en god start på bacheloren i form av inspirasjon og gode råd samt gitt oss faglig innsikt og kunnskap, og ikke minst for hennes positive energi.

Til slutt en spesiell takk til Sander, som har tatt oss veldig godt imot, lagt alt godt til rette med veiledning og råd og ikke minst for sin fleksible tid til å hjelpe oss ved behov. Takk for din støtte gjennom hele dette prosjektet.

Gjennom dette semesteret har vi fått muligheten til å lære utrolig mye, og samtidig hatt det veldig gøy. Takk til alle som har gjort denne tiden på Rikshospitalet så svært inspirerende og utrolig bra. Dette vil aldri bli glemt.

Oslo 26. mai 2023

Innholdsfortegnelse

Forkortelser	1
Sammendrag	4
1. Innledning.....	5
1.1 Metabolomikk	5
1.2 Biologiske prøvematerialer som blir brukt i metabolomikk.....	7
1.2.1 Urin og blod	7
1.2.2 Dried Blood Spot – DBS	8
1.3 Målrettet og ikke-målrettet metabolomikk	10
1.3.1 Arbeidsflyt i global metabolomikk.....	11
1.3.2 Analytiske teknikker som anvendes i metabolomikk	13
1.4 Hensikt med oppgaven.....	15
2. Metode	16
2.1 Væsekromatografi – HPLC.....	16
2.2 Massespektrometri – MS	18
2.2.1 Ionekilde	18
2.2.2 Masseanalysator.....	19
2.3 Kvalitetssikring.....	20
2.3.1 Pooled Quality Control – PQC.....	20
2.3.2 System Suitability Test – SST	22
2.4 Dataanalyse og statistikk	24
2.4.1 Prinsipal Komponent Analyse – PCA	24
2.4.2 Vulkanplott	24
2.4.3 Box Whisker plott	25
2.5 Forsøksdesign	26
2.5.1 Forsøksplan.....	26
2.5.2 Diettplan	27
2.5.3 Prøvetaking.....	27
2.5.4 Relevante metabolitter knyttet til metabolske endringer ved trening.....	28
3. Eksperimentelt	32
3.1 Kjemikalie- og materialeliste	32
3.1.1 Kjemikalier	32
3.1.2 Utstyr	32
3.1.3 Materialer	33
3.2 Løsninger	33
3.2.1 Ekstraksjonsløsning	33
3.2.2 Kalibreringsløsninger	33
3.3 Prøveopparbeidelse av DBS.....	33

3.4 HPLC-betingelser	34
3.5 MS-betingelser	36
3.6 Programvare	37
4. Resultater og diskusjon	38
4.1 Kontroll av PQC-prøvenes kvalitet	39
4.2 Treningsmetabolomet	42
4.2.1 Metabolitter knyttet til adenin-nukleotid-katabolisme som blir påvirket av trening.....	42
4.2.2 Melkesyre påvirket av trening.....	46
4.2.3 Taurin påvirket av trening	48
4.2.4 Fenylalanin påvirket av trening	49
4.2.5 Lac-Phe som biomarkør.....	50
4.3 Metabolitter hvor det ikke er observert endring i nivåer som følge av trening	54
4.3.1 Fettsyrene, oljesyre og linolsyre.....	55
4.3.2 Metabolitter i sitronsyresyklusen, fumarat og suksinat.....	57
4.3.3 Nevrotransmittere, acetylkolin og kolin.....	59
4.4 Mulig biomarkør av ukjent identitet	61
5. Oppsummering og diskusjon.....	66
6. Konklusjon og videre arbeid	69
Litteraturliste.....	71
Vedlegg.....	75
Vedlegg A – Søknad til Regional komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk.....	75
Vedlegg B - Oversikt over diett.....	81
Vedlegg C – Sekvensfil som ble benyttet i forsøket	85

Forkortelser

Forkortelse	Betydning / Definisjon
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosin-5'-difosfat
AMP	Adenosin-5'-monofosfat
ATP	Adenosin-5'-trifosfat
a.u.	Arbitrary unit
DBS	Dried Blood Spot
DDA	Data-Dependent Acquisition
ESI	Elektrosprayionisasjon
FA	Formic acid (maursyre)
FC	Fold change (fold endring)
GC	Gas Chromatography (Gasskromatografi)
HCD	Higher-Energy Collisional Dissociation
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (væskekromatografi)
IMP	Inosinmonofosfat
Lac-Phe	N-laktoyl-fenylalanin
LC-MS / HPLC-MS	Væskekromatografi-massespektrometri
LOD	Limit of detection (deteksjonsgrense)
LysoPC	Lyso-fosfatidylkolin
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid

NFS	Nyfødtscreening
NMR	Kjernemagnetisk resonans
N ₂	Nitrogengass
MeOH	Metanol
MS	Massespektrometri
<i>m/z</i>	Masse-til-ladning forhold
PC	Prinsipal komponenter
PCA	Prinsipal komponent analyse
ppm	Parts Per Million (Andeler per million)
PQC	Pooled Quality Control (samlet kvalitetskontroll)
Q1	Første kvartil
Q2	Andre kvartil / median
Q3	Tredje kvartil
RF	Radio frekvens
rpm	Revolutions Per Minute (Omdreininger per minutt)
RSD	Relativ standardavvik
RT	Retensjons tid
SST	System Suitability Test
TA, TB, TC, TD, TE	Forsøksperson A, B, C, D, E
TCA - syklus	Trikarboksylsyresyklus

UHPLC

Ultra-High-Performance Liquid Chromatography

Sammendrag

Metabolomet i kroppen påvirkes av en rekke faktorer, som kosthold, alder, kjønn og genetikk, men også av trening. Treningsmetabolismen refererer til de biokjemiske og fysiologiske endringene som skjer i kroppen under fysisk trening. Ved bruk av global metabolomikk, kan man identifisere metabolitter som fungerer som biomarkører for treningsmetabolomet. Ved å sammenligne de metabolske endringene før og etter trening, kan man oppdage metabolitter som er assosiert med treningsrespons, -ytelse og -intensitet.

Formålet med denne oppgaven var å påvise potensielle biomarkører knyttet til trening. Utgangspunktet var en allerede etablert LC-MS/MS-metode til analyse av metabolomet, samt prøveopparbeidingen av «Dried Blood Spot». Målet var å detektere metabolske endringer knyttet til trening.

En gruppe med fem deltakere gjennomførte en høyintensiv treningsøkt for å påvise metabolske endringer som oppstår i kroppen under og etter trening. For å sikre at eventuelle forskjeller skyldes trening og redusere variasjoner som kan skyldes ulikheter i kostholdet, fulgte alle forsøkspersonene en identisk diett.

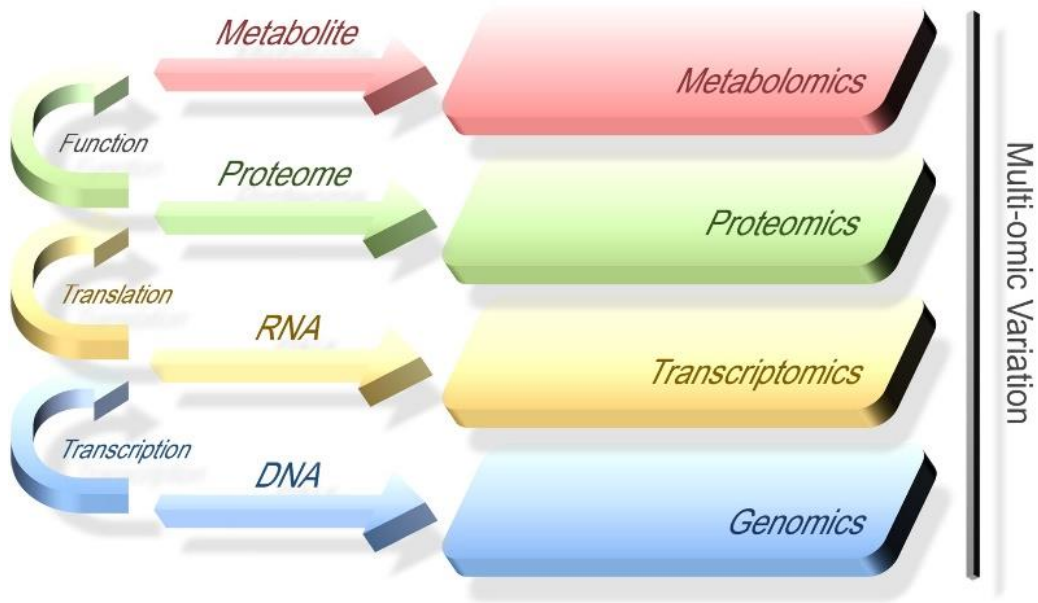
Flere metabolitter ble påvist som potensielle biomarkører. For eksempel ble hypoxantin, melkesyre, taurin og fenylalanin funnet å være økt i prøver rett etter trening, mens adenosin-5'-monofosfat viste en minskning. I tillegg økte Lac-Phe i mengde hos noen av forsøksprøvene rett etter trening. Lac-Phe er en nyoppdaget biomarkør for trening som det er knyttet stor interesse til. Det ble også påvist en ukjent forbindelse med to «features» som viste en kraftig økning umiddelbart etter trening og en etterfølgende rask retur til utgangspunktet. Potensielt kan denne forbindelsen vise seg å være meget god markør for intens fysisk aktivitet, og inngå i biokjemiske signaturer for treningsmetabolomet.

Det å identifisere potensielle biomarkører knyttet til trening er både viktig og kan være avgjørende for tidlig deteksjon av potensielle helseproblemer og livsstilssykdommer, som for eksempel diabetes, fedme og hjerte- og karsykdommer, men også for å kunne skille metabolske endringer knyttet til trening fra patologiske prosesser.

1. Innledning

1.1 Metabolomikk

Innenfor biologi benyttes begrepet «omics» for å beskrive en helhetlig tilnærming til studiet av biologiske systemer, der en analyserer og forstår ulike molekylære nivåer samtidig [1]. De største fire omics-teknologiene er genomikk, transkriptomikk, proteomikk og metabolomikk (se **Figur 1**). Alle de nevnte omics-teknologiene har mål om å identifisere og beskrive fysiske egenskaper og biokjemiske prosesser som forekommer i celler og vev [2]. Metabolomikk er studien av metabolitter som til sammen utgjør det såkalte metabolomet. Metabolomikk har i noen tilfeller flere fortrinn enn proteomikk og genomikk [3]. Metabolomet gir et nøyaktig øyeblikksbilde av den biokjemiske statusen på prøvetakingstidspunktet, og er det nærmeste man kommer pasientens kliniske fenotype. Det finnes færre endogene metabolitter sammenlignet med endogene proteiner, gener og transkriptomer, som fører til færre tolkningsdata for endogene metabolitter. I metabolomikk brukes analytiske metoder for å kvantifisere og identifisere metabolittene. Det er ikke alltid lett å analysere hele metabolomet på engang på grunn av dens enorme mangfold av kjemiske strukturer og store variasjoner. Likevel finnes det hjelpemidler som gjør det mulig å analysere et stort antall metabolitter samtidig. De mest brukte er massespektrometri (MS) koblet til kromatografiske separasjonsteknikker som gaskromatografi (GC) og væskechromatografi (LC). Også kjernemagnetisk resonans (NMR) kan benyttes [4].



Figur 1: Illustrasjon av omics-teknologiene metabolomikk, proteomikk, transkriptomikk og genomikk. De buede pilene til venstre indikerer sammenhengen mellom de biologiske prosessene som de ulike omics-teknikkene tar for seg. De rette pilene i midten viser biomolekylene som utgjør de ulike omics-teknologiene [5].

Metabolitter utgjør en gruppe av molekyler som finnes i en biologisk prøve og har en lav molekylvekt (< 1500 Da) sammenlignet med proteiner og andre makromolekyler. Disse molekylene spiller ulike roller som mellomprodukter, substrater eller sluttprodukter i de mangfoldige biokjemiske reaksjonene som kontinuerlig forekommer i en organisme. Metabolitter omfatter også legemidler, næringsstoffer og andre stoffer som vi inntar gjennom mat og drikke, samt de som kommer fra mikrobiomet i kroppen [6].

Metabolomet er dynamisk og gir et detaljert og presist øyeblikksbilde av individets biokjemiske status [6]. Metabolomet er definert som det kvantitative komplementet av metabolitter i et biologisk system, som vil si at det omfatter metabolitter som stammer fra en rekke prosesser [7]. Metabolomet kan deles inn i flere grupper, det endogene metabolomet, mikrobielle metabolomet og det eksogene metabolomet. Det endogene metabolomet inkluderer alle metabolitter som er karakteristiske for hver organisme, vev eller cellype. Det mikrobielle metabolomet produseres av mikrofloraen. Det eksogene metabolomet, xenometabolomet, omfatter metabolitter som er fremmed for kroppen, det vil si det som kommer fra kosthold, legemidler og forurensninger [8].

Det er viktig å karakterisere det «normale» metabolomet for å kunne finne og forstå biomarkører som er knyttet til faktorer som påvirker metabolomet, på grunn av sykdom eller livsstilsfaktorer som kost og fysisk aktivitet. Normalmetabolomet oppviser den forventede variasjonen i metabolitter observert for en frisk populasjon. Det er ikke enkelt å vite hva det «normale» metabolomet for en populasjon er, med tanke på at metabolomet kan påvirkes av ulike faktorer som kjønn, alder, medisininntak, sykdom, fysisk aktivitet, kosthold og miljøeksponering. For å kunne skille det friske metabolomet fra et metabolom som indikerer en sykdom, må man se på normalvariasjonen. Når man er syk vil metabolomet se annerledes ut enn normalmetabolomet. Det kan for eksempel være mangel på metabolitt, en ekstra metabolitt eller at konsentrasjonen til en metabolitt, eller flere metabolitter, er for lav eller høy.

1.2 Biologiske prøvematerialer som blir brukt i metabolomikk

De mest brukte biologiske prøvematerialene i metabolomikk er blod og urin. Andre biologiske prøvematerialer som også kan bli benyttet er spinalvæske, spytt, avføring, svette og væsker som blir utskilt fra for eksempel bryst [9]. Det finnes flere likheter og ulikheter mellom urin og blod når det gjelder tilgjengelighet, sammensetning og hvor nyttig det er i metabolske studier. En vanlig teknikk for prøvetaking av blod til metabolomikk er å lage dried blood spots (DBS) fra et stikk i en fingertupp.

1.2.1 Urin og blod

Blod har mange forskjellige oppgaver i kroppen, men en av blodets mest grunnleggende oppgaver er transport av oksygen, karbondioksid og næringsstoffer. Blodet inneholder et bredt spekter av metabolitter, som inkluderer både fettløselige og vannløselige forbindelser. Urin derimot består hovedsakelig av avfallsprodukter og overskuddsstoffer som skilles ut av nyrene, inkludert metabolitter, urea, vann og organiske syrer og baser [10]. I tillegg kan stabiliteten på metabolitter i blod og urin være ulike. Metabolitter i blodet er utsatt for konstante endringer grunnet metabolske prosesser, enzymaktivitet og interaksjoner med celler og vev. Metabolitter i urinen er ofte mer stabile på grunn av at de skilles ut av blodet og blir mindre påvirket av enzymatiske, metabolske prosesser. Forbindelsene i urinen har ofte gjennomgått en rekke metabolske omdannelser i kroppen før den blir utskilt. Disse

metabolske omdannelsene kan være enzymatisk katalyserte reaksjoner som bryter ned eller modifierer de opprinnelige stoffene, og resulterer i dannelse av ulike metabolitter som detekteres i urinen. Dermed kan urinen betraktes som sterkt omdannet i den forstand at den inneholder metabolitter dannet gjennom en rekke metabolske prosesser i kroppen [9]. Dette gjør den kvantitative analysen mer utfordrende, spesielt på grunn av dens avhengighet av kroppens væskebalanse. Denne utfordringen kan løses ved å korrigere resultatene for analysen gjennom å justere for kreatininkonsentrasjonen i urinen. Kreatinin fungerer som en stabil biomarkør som viser en proporsjonal sammenheng med kroppens væskebalanse og dermed urinens konsentreringsgrad. Kreatininkonsentrasjonen kan derfor benyttes til å normalisere de analytiske resultatene [11].

Urin kan samles i store mengder og er mer tilgjengelig i motsetning til blod. Innhenting av urinprøver er en ikke-invasiv og enkel metode, som tilfredsstillende studier i stor skala. Blodprøver derimot tas oftest som venepunksjon, noe som krever kvalifiserte personer til å ta prøvene. Dette er mer invasivt, og ved punktering av huden øker også risiko for infeksjoner dersom dette ikke gjøres riktig. Det finnes alternative teknikker og metoder for innhenting av blodprøver, blant annet DBS-prøver (**kapittel 1.2.2**). I tillegg gir blod et mye mer presist øyeblikksbilde av metabolomet og gir mer informasjon om et individs status enn urin.

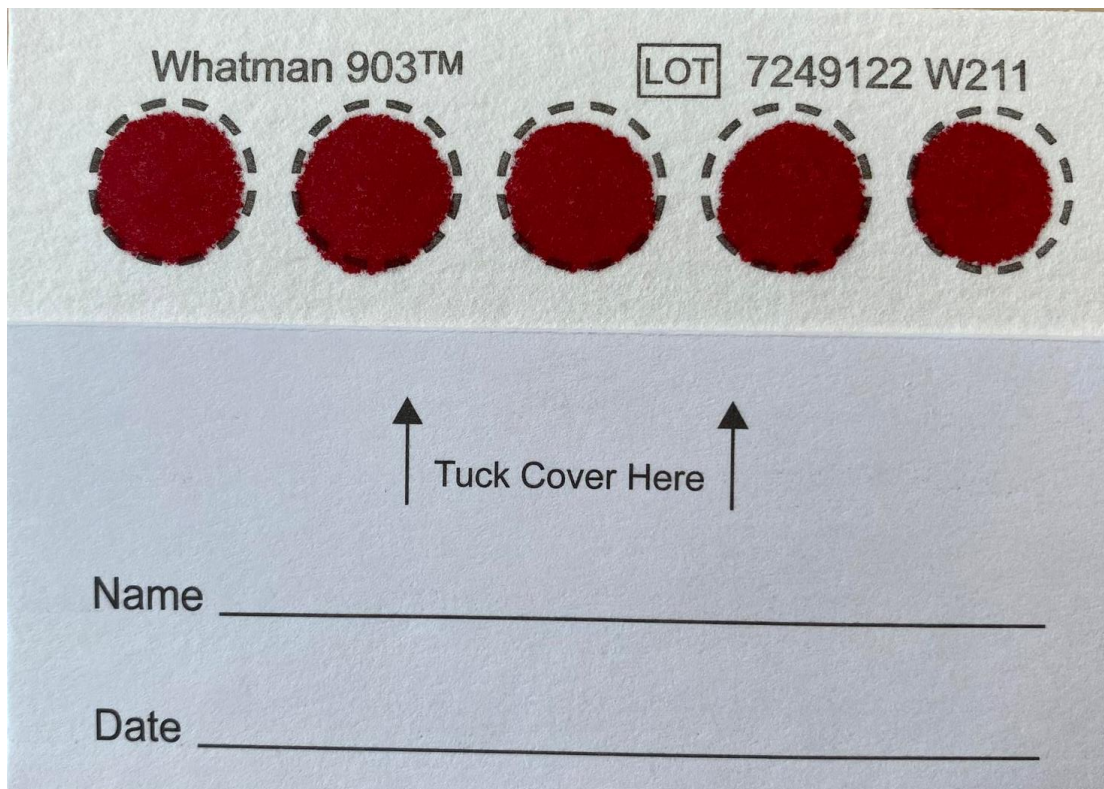
1.2.2 Dried Blood Spot – DBS

DBS er en prøvetakingsteknikk der små volumer av blod tørkes på filterpapir. DBS er viktig innen global metabolomikk på grunn av dens mange fordeler sammenlignet med tradisjonell blodprøvetaking. Ifølge en rapport fra ACS Publications [12], er det observert mer metabolitter i DBS prøver enn i plasmaprøver, mest sannsynlig på grunn av forekomsten av røde og hvite blodceller. Metabolomet i en DBS-prøve har således metabolitter både fra plasma og fra intracellulærvæsken. Prøvetaking av tørkede blodflekker brukes i økende grad i diagnostikk og er mye brukt i nyfødtscreening (NFS) for å se etter underliggende sykdommer hos nyfødte [13]. I nyfødtscreeningsmiljøet har det vært godt anerkjent at DBS er det beste materialet for å teste nyfødte [14]. Små volumer av blod i filterpapir gjør det spesielt gunstig for NFS ettersom en slipper å ta større blodvolumer av de nyfødte.

Fordelene med DBS-teknikken er at den har god holdbarhet siden analyttene stabiliseres gjennom adsorpsjonseffekter i papiret og inntørking som inaktiverer enzymatiske reaksjoner. God holdbarhet og lett lagring gjør at DBS-kortene kan transporteres enkelt rundt om i verden. Det er også lavere smittefare med DBS enn når man jobber med sprøytespisser og fullblod i væskefasen [15]. Totalt sett er DBS en praktisk, kostnadseffektiv og minimalt invasiv prøvetakingsteknikk som gir mange fordeler i forhold til tradisjonelle blodprøvetakingsteknikker.

Filterpapiret er laget av bomullsfibre, som består av cellulose. Cellulose er en polymer av glukose og disse interagerer med andre cellulosepolymertråder ved omfattende hydrogenbindinger. Adsorpsjon av blod på filterpapiret kan redusere interaksjon mellom analyttene og filterpapiret. Dette kan skyldes redusert diffusjon, som betyr at blodet sprer seg og danner en tynn film, og analyttene blir mer jevnt fordelt i det porøse materialet. Dette bidrar til at analyttene er mer stabile, men det er spesielt inntørking og den derav følgende inaktivering av enzymer, som bidrar mest til metabolittenes stabilitet. I tørr form er polymerene tett bundet til andre tråder, men tilsetning av for eksempel vann vil forstyrre hydrogenbindingene og grenseflaten mellom polymertrådene [15]. Dette fører til en utvidelse av avstanden mellom polymerene sammenlignet med tørt materiale.

Mengde blod på filterkortet varierer fra person til person og korttype. Filterpapiret som ble brukt i dette forsøket er vist **Figur 2**, der det såkalte «blodspottet» har en diameter på 1,2 cm og kan inneholde opptil 50 μL blod. En bruker en puncher for å lage sirkulære hull i blodspottet for videre opparbeidelse. Diameteren på en punch er 3,2 mm, noe som tilsvarer ca. 3,0 μL blod (2,5 μL og opptil 5,0 μL blod).



Figur 2: Illustrasjon av dried blood spot.

Hematokrit er en måling som referer til andelen røde blodceller i en persons blod og uttrykkes som en prosentdel av det totale volumet av blod i kroppen. Normalnivå av hematokrit hos menn er fra 41% til 50% og hos kvinner er det 36% til 48%. Siden hematokrit er direkte proporsjonal med viskositeten til blod, påvirker det størrelsen på blodspottet og fordelingen på kortet. Om hematokritnivået er høy kan fordelingen av blodet gjennom DBS-kortet være dårlig da samme blodvolum resulterer i en kortere vandringsslengde og en mindre blodflekk på papiret, sammenlignet med blodprøver med lav hematokritnivå. Dette kan føre til en høyere målt analyttkonsentrasjon enn fra prøvene med lav hematokrit DBS-kort [15].

1.3 Måltrettet og ikke-måltrettet metabolomikk

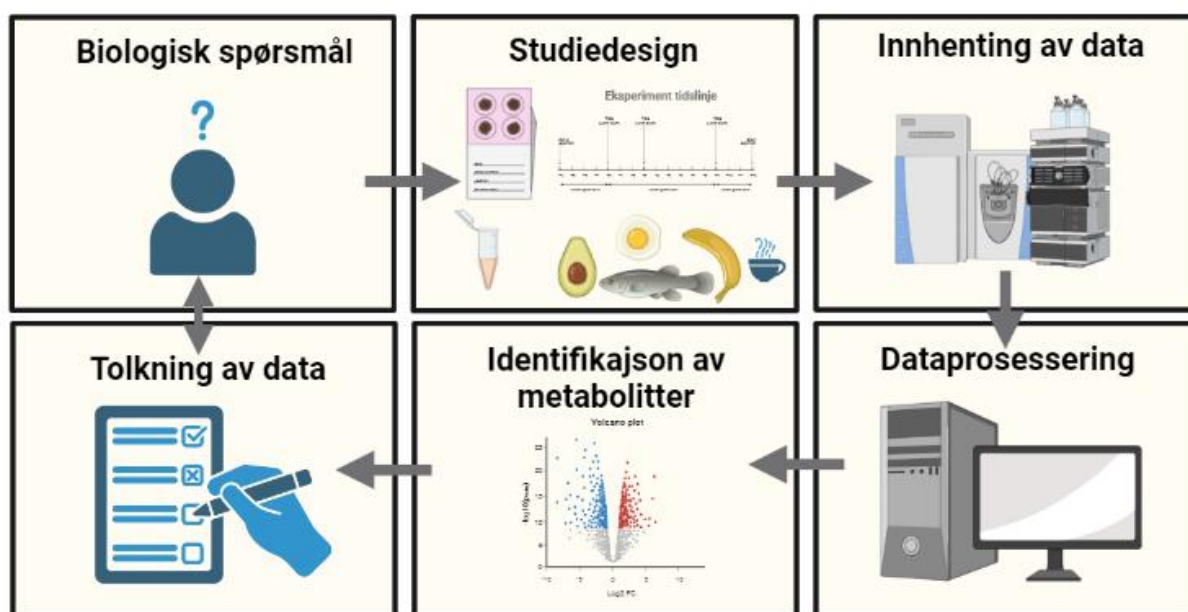
Metabolomikkanalyse kan deles inn i to hovedkategorier, måltrettet og ikke-måltrettet. Hver tilnærming har sine fordeler og begrensninger. Måltrettet metabolomikk er rettet mot å identifisere og kvantifisere et begrenset antall kjente metabolitter, og slik tilnærming brukes ofte i kliniske analyser [16]. Dette vil også si at prøveopparbeidelsen er optimalisert for å

bestemme disse forhåndsutvalgte analyttene. Global metabolomikk, som er et annet ord for ikke-målrettet metabolomikk, er hypotesegenererende ved at en ofte ikke har noen hypotese på forhånd før analysen kjøres og dataen hentes. Det utføres vanligvis for å samle og analysere så mange som mulig påvisbare metabolitter i en prøve som gjennomgår både kjente og ukjente metabolske endringer. Dataen som høstes fra ikke-målrettet analyse kan brukes til å forklare biokjemiske konsekvenser og identifisere mulige biomarkører [17]. I tillegg kan det generere hypoteser som kan studeres videre med målrettede tilnærminger.

Identifisering av metabolitter og biomarkører er aktuelt i global metabolomikk for å kunne trekke biologiske konklusjoner. Mange metabolitter kan gi informasjon om biokjemisk status, helse og sykdom, men få får status som biomarkør. En biomarkør fungerer som en påvisbar biologisk indikator som kan brukes til å evaluere fysiologiske, patologiske eller farmakologiske prosesser. Den benyttes til å oppdage og identifisere biologiske endringer og for å diagnostisere sykdommer. Metabolitter er et molekylært produkt eller substrat som er involvert i biokjemiske reaksjoner i celler, vev eller organismer. Disse oppstår som et resultat av metabolske prosesser. Noen metabolitter kan fungere som biomarkør, men ikke alle biomarkører er nødvendigvis metabolitter. Biomarkører brukes ofte for å diagnostisere sykdom, overvåke utvikling av sykdommer og vurdere effektiviteten av en behandling. Eksempler på biomarkører er genetiske mutasjoner, blodtrykk, kolesterolnivåer og en lang rekke enkeltmetabolitter [18].

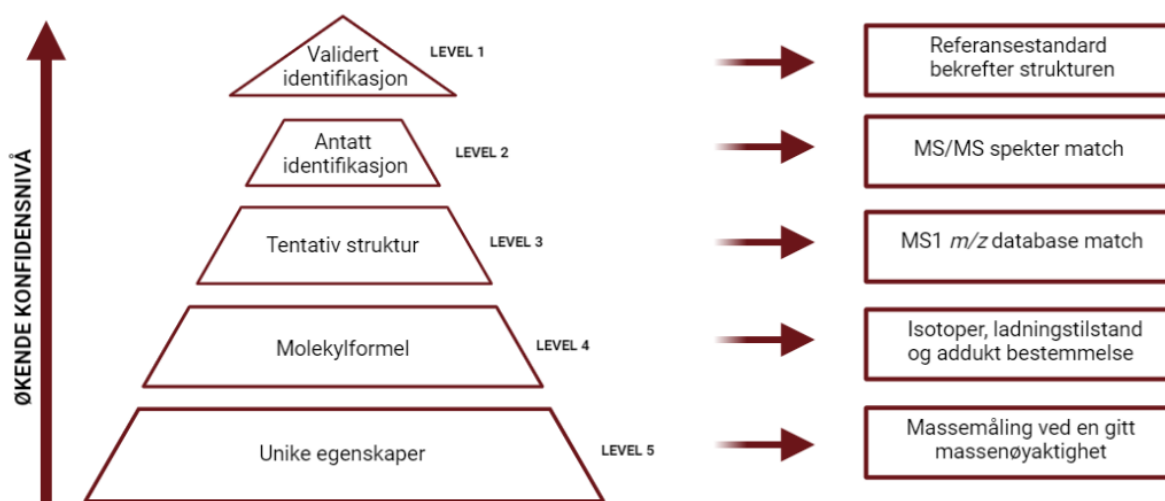
1.3.1 Arbeidsflyt i global metabolomikk

Metabolomikkforsøk følger en omfattende og inkluderende arbeidsflyt som er egnet for eksperimentet og prøvetypen som skal studeres. Arbeidsflyten inkluderer studiedesign, anskaffelse/analysering av analytiske prøver, dataprosessering, identifikasjon og tolkning av resultater [19]. **Figur 3** viser typiske steg av en global metabolomikk arbeidsflyt. Det finnes flere alternativer for hvert trinn i arbeidsflyten, der en må komme fram til hvilken alternativ som er den riktige for det valgte forsøket, samtidig som det skal sikre robuste og godkjente resultater. Målet med et studiedesign er å lage et forsøk og hente ut informasjon om et bredt spekter av metabolitter som finnes i metabolske veier og at etterfølgende analyse av dataen kan gi svar på biologiske spørsmål som stilles [19]. Disse typer studier er hypotesegenerende.



Figur 3: En typisk arbeidsflyt for global metabolomikk. Arbeidsflyten starter med biologiske spørsmål som utgangspunkt for så å sette opp et studiedesign for å analysere prøvene. Identifisering av metabolitter etterfølger samtidig som statistisk analyse også kan gjennomføres. Tolkning av resultater kan gi svar på hypoteser relatert til biologiske spørsmål. Figuren er hentet fra [19].

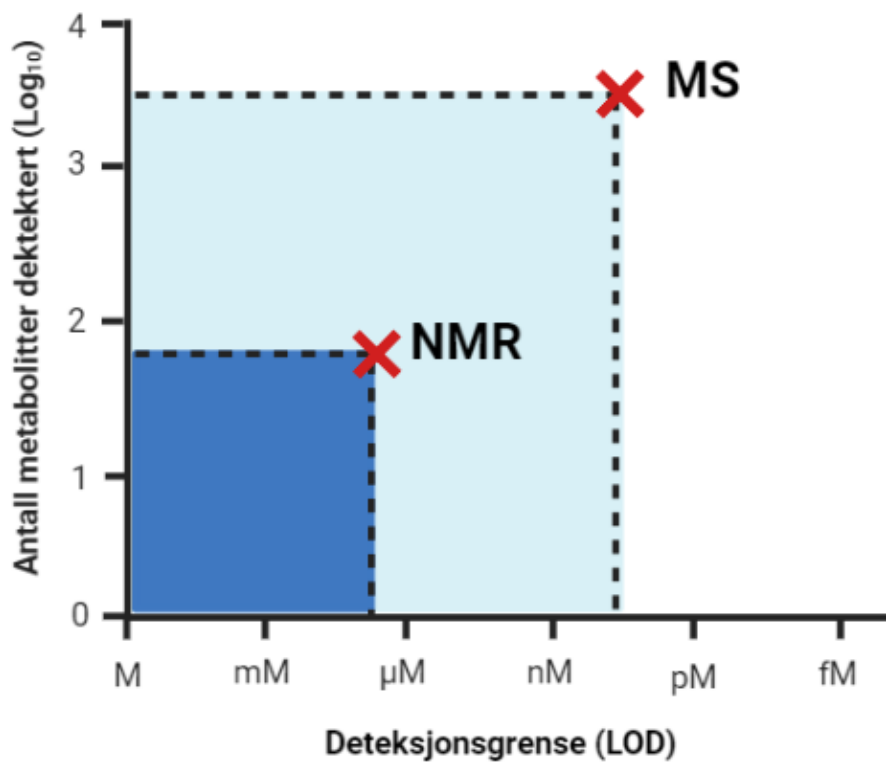
En viktig del av en global metabolomikk arbeidsflyt, er identifikasjon av metabolitter. I metabolomikk deler man opp identifikasjonen av metabolitter i konfidensnivåer (se **Figur 4**). Det laveste nivået (nivå 5) er et observert masse-til-ladningsforhold (m/z -verdi) med en gitt massenøyaktighet for den ukjente forbindelsen. Molekylformel er ikke kjent, og man vet generelt lite annet utover den målte m/z -verdien. Dette kan brukes til å søke i databaser for å finne molekylformelen, men en vil sannsynligvis treffe på mange liknende forbindelser. For å øke konfidensnivå til 3 og 4, kan en se etter ytterligere informasjon som retensjonstid, isotopsammensetning, fragmenteringsspekter, strukturformel og identifisere addukter. For å oppnå høyeste konfidensnivå, nivå 1 og 2, bør retensjonstid, ionemasser og fragmenteringsspekter stemme overens med databaser og In-house bibliotek [16]. For høyeste grad av konfidens kan identiteten valideres ved analyse av en ren referansestandard, dersom en slik er tilgjengelig.



Figur 4: Pyramide som viser de ulike konfidensnivåene i «Level Of Confidence» [16].

1.3.2 Analytiske teknikker som anvendes i metabolomikk

Ettersom metabolomet består av mange metabolitter, setter den globale metabolomikk-tilnærmingen høye krav til den analytiske teknikken som brukes. Teknikker som oftest benyttes i metabolomikk er NMR og MS. MS er en svært sensitiv metode og den muliggjør analyse av flere tusener av metabolitter fra en enkelt måling. Grunnen til at MS brukes oftere enn NMR, er fordi den kan detektere flere metabolitter i en prøve sammenlignet med NMR. I tillegg har NMR lavere sensitivitet (LOD) sammenlignet med MS, som vist i **Figur 5**. LOD er det laveste signalet som kan måles og som har en statistisk signifikans for at det skiller seg fra bakgrunnsstøyen i målingene. Massespektrometrisk deteksjon kombineres ofte med en kromatografisk eller elektroforetisk separasjon – såkalte hybridteknikker [20]. Fordelen med å kombinere kromatografi med MS er at det resulterer i en kraftig analysemetode som utnytter både kromatografiens evne til separasjon og massespektrometriens nøyaktige og selektive deteksjon. Ved å kombinere disse teknikkene oppnår man bedre sensitivitet og spesifisitet sammenlignet med å bruke hver teknikk alene. Dette gjør det mulig å oppdage og kvantifisere analytiske substanser med større presisjon og selektivitet [21].



Figur 5: Relativ følsomhet for metabolomikkplattformer basert på massespektrometri (MS) og kjernemagnetisk resonans (NMR). MS kan detektere metabolitter mellom nM og pM konsentrasjoner, mens NMR kan detektere metabolitter mellom mM og μM konsentrasjoner. Figuren er hentet fra [22].

1.4 Hensikt med oppgaven

Metabolomet i kroppen påvirkes av en rekke faktorer, som kosthold, alder, kjønn og genetikk, men også av trening. Treningsmetabolismen, også kalt for treningstoffsiftet, refererer til de biokjemiske og fysiologiske endringene som skjer i kroppen under og etter fysisk trening. Når en trener, øker kroppens behov for energi, som fører til en rekke metabolske endringer for å imøtekomme dette behovet. Studier av treningsmetabolismen gir verdifull innsikt i kroppens normale metabolisme på flere måter. Dette kan øke forståelsen av hvordan kroppen fungerer under forskjellige forhold, inkludert hvordan forskjellige metabolske prosesser er relatert til hverandre, og hvordan de påvirker kroppens funksjon på kort og lang sikt.

Gjennom påvisning av biomarkører knyttet til treningsmetabolomet kan vi oppnå en bedre forståelse av sammenhengen mellom trening, metabolske prosesser og helsestatus. Identifikasjon og måling av treningsrelaterte metabolitter gir mulighet for å avdekke sammenhenger mellom disse biomarkørene og metabolske tilstander som diabetes, fedme og hjerte- og karsykdommer. Denne informasjonen kan være avgjørende for tidlig deteksjon av potensielle helseproblemer og gir mulighet for å iverksette nødvendige tiltak for forebygging og behandling.

Hensikten med denne oppgaven er å påvise biokjemiske biomarkører for trening, ved å oppdage fysiologiske endringer i metabolomet som er knyttet til trening. For å oppnå dette, ble det utført en DBS-analyse på ni friske frivillige som ble delt inn i to grupper, en treningsgruppe og en kontrollgruppe. Treningsgruppen bestod av fem forsøkspersoner som gjennomførte en høyintensiv treningsøkt, mens kontrollgruppen bestod av fire forsøkspersoner som ikke deltok i treningsøkten. For å minimere variasjoner som skyldes forskjeller i kostholdet, og sikre at eventuelle påviste forskjeller skyldes treningen, fulgte alle forsøkspersonene en identisk diett.

Hypotesen bak forsøket var at trening har en umiddelbar effekt på metabolismen, og at denne effekten kunne detekteres ved hjelp av global metabolomikk.

2. Metode

2.1 Væskekromatografi – HPLC

HPLC er en forkortelse for High-Performance Liquid Chromatography. "Kromatografi" er en teknikk for å separere, mens «kromatogram» er resultatet en får av kromatografi. Det finnes ulike former for væskekromatografi, blant annet Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) som er benyttet i denne oppgaven. UHPLC skiller seg fra vanlig HPLC ved å ha mindre partikkelstørrelse i kolonner, vanligvis 1-2 μm i UHPLC og 3-5 μm i HPLC. Jo mindre partikkelstørrelsen er, desto høyere oppløsning og bedre separasjon av analytt i prøven får man.

Systemet består i hovedsak av en pumpe, injektor, filter, kolonne, detektor og en dataprosessor. Pumpen har i oppgave å levere mobilfasen med konstant strømningshastighet og med god presisjon gjennom systemet, slik at injektoren kan injisere prøven i mobilfasestrømmen. Separasjon av analytter i prøver er bestemt av likevektsfordeling mellom mobilfasen og stasjonærfasen. Det finnes flere ulike stasjonærfaser som passer til ulike behov, der en velger stasjonærfase ut ifra analyttene man vil separere fra hverandre. To eksempler på kromatografiske separasjonsteknikker er normal fase og omvendt fase. De separerte forbindelsene blir sendt videre til en detektor for å bli detektert, for så å bli tolket og analysert i en datamaskin med dedikerte programvarer [23].

Stasjonærfasen i omvendt fase kromatografi er lite polart eller ikke-polar med et løsningsmiddel som er mer polart. I omvendt fase kromatografi separeres forbindelser med tilstrekkelige hydrofobe egenskaper slik at den kan bindes til stasjonærfasen. For å øke elueringsstyrken, kan en benytte en mobilfase som er lik i polaritet som stasjonærfasen. En av fordelene med en omvendt fase kromatografi er redusering av «tailing» i stor grad. Tailing er når en kromatografisk topp blir asymmetrisk fordi det er blitt dannet uønskede interaksjoner mellom analytt og stasjonærfase [24].

Bruken av LC sammen med MS, som er blitt benyttet i denne oppgaven, gir mange fordeler når en skal analysere metabolomet. Med tanke på at metabolomet omfatter et bredt spekter av små og store forbindelser, kan LC-MS analysere et bredt spekter av metabolitter.

LC-MS har høy selektivitet, som betyr at den kan skille ut metabolitter fra biologiske prøver basert på deres m/z -verdi og kjemiske egenskaper, som fører til et økt antall med identifiserbare forbindelser og reduksjon av matrikseffekter som ionesuppresjon. I tillegg gir LC-MS en dimensjon til bestemmelsen av analyttene for å identifisere isomerer og gir retensjonstiden for å identifisere det en er ute etter [12].

I metabolomikk studier er omvendt fase kromatografi egnet for analyse av metabolitter med forskjellige polaritetsegenskaper. På grunn av den hydrofobe stasjonærfasen vil den danne sterkere interaksjoner med hydrofobe forbindelser og elueres ut senere (lenger retensjonstid). For hydrofile forbindelser, dannes det interaksjoner med en passende mobilfase som oftest består av vann og metanol. På grunn av at hydrofile forbindelser foretrekker å interagere med mobilfasen, vil den danne svakere interaksjoner med stasjonærfasen. Dette fører til at de polare forbindelsene vil elueres tidligere enn de upolare. Dette ligger i grunn for prinsippet «likt løser likt», der analyttene løser seg bedre i stoffer som har en polaritetsmatching med dem selv [25].

I denne oppgaven er det benyttet omvendt fase med difenyl-kolonne (Pursuit XRs difenyl). Forskjellen mellom difenyl-kolonnen og den vanligste og mest brukte, C18-kolonnen, er difenylgrupper. Pursuit XRs difenyl separerer forbindelser med ulik polaritet ved å gi ekstra interaksjoner, som for eksempel π - π -interaksjoner, hydrofobe og polare interaksjoner. π - π -interaksjoner dannes med aromatiske eller konjugerte forbindelser og er nyttig for separasjon av metabolitter som består av slike grupper [26]. Denne kolonnen er godt egnet til forsøket, med tanke på at analyttene i blod har forbindelser som er polare til mindre polare.

2.2 Massespektrometri – MS

2.2.1 Ionekilde

Elektrosprayionisasjon (ESI) er en ioniseringsteknikk som brukes ofte i koblingen mellom en væskrokromatografi og et massespektrometer, LC-MS. Her blir mobilfasen pumpet gjennom et tynt kapillærrør, med en strømningshastighet på 1-1000 $\mu\text{L}/\text{min}$, inn i et oppvarmet spraykammer [27]. Det er satt opp en høyspenning mellom dysen på kapillæret og elektroden i spraykammeret, og dette fører til en effektiv aerosoldannelse av prøven. Aerosoldannelse skyldes også tilsetning av varm spraygass (nitrogen). Dette vil si at væskedråpene i løsemiddelet vil fordampes til mindre dråper, og ladningstettheten i dråpene vil øke til det nivået som gjør at dråpene blir ustabile og vil «sprekke» til mindre dråper i det elektriske feltet. Til slutt vil alt av løsemiddelet fordampes, og ionene er frigitt til gassfase. Forbindelsene må være ioniserbare for å bli detektert, for nøytrale molekyler detekteres ikke [28].

I elektrospraykilden finnes det en modus som kan styres, der en kan velge mellom positiv eller negativ ionisasjon. Her kan ionene dannes enten gjennom protonabstraksjon $(\text{M}-\text{H})^-$ ved tilsetning av base i mobilfasen eller protonoverføring $(\text{M}+\text{H})^+$ [28]. Protondonorer som for eksempel maursyre og eddiksyre tilsettes til mobilfasen for å øke ioniseringsgraden.

Til tross for at ESI har bred bruk, så er ikke denne typen ionekilde effektiv til ionisering av upolare forbindelser. ESI er egnet for forbindelser med høy til moderat polaritet i tillegg til varierende molekylvekt. En ulempe med ESI er ionesuppresjon som kan skyldes to hovedfaktorer. Den første er at matrikskomponenter tar vekk ladning fra analyttene, slik at ioneproduksjonen av disse blir hemmet. Dette kan motvirkes gjennom passende prøveoppbeiring og kromatografisk separasjon før ESI, slik at analyttene som kommer inn i ESI er separert fra matrikskomponenter og andre analytter. Den andre faktoren er dårlig forstøvning og forgassing av mobilfasen. Dette motvirkes gjennom valg av mobilfasekomponenter, og den mest foretrekkende organiske komponenten er acetonitril (ACN) [27].

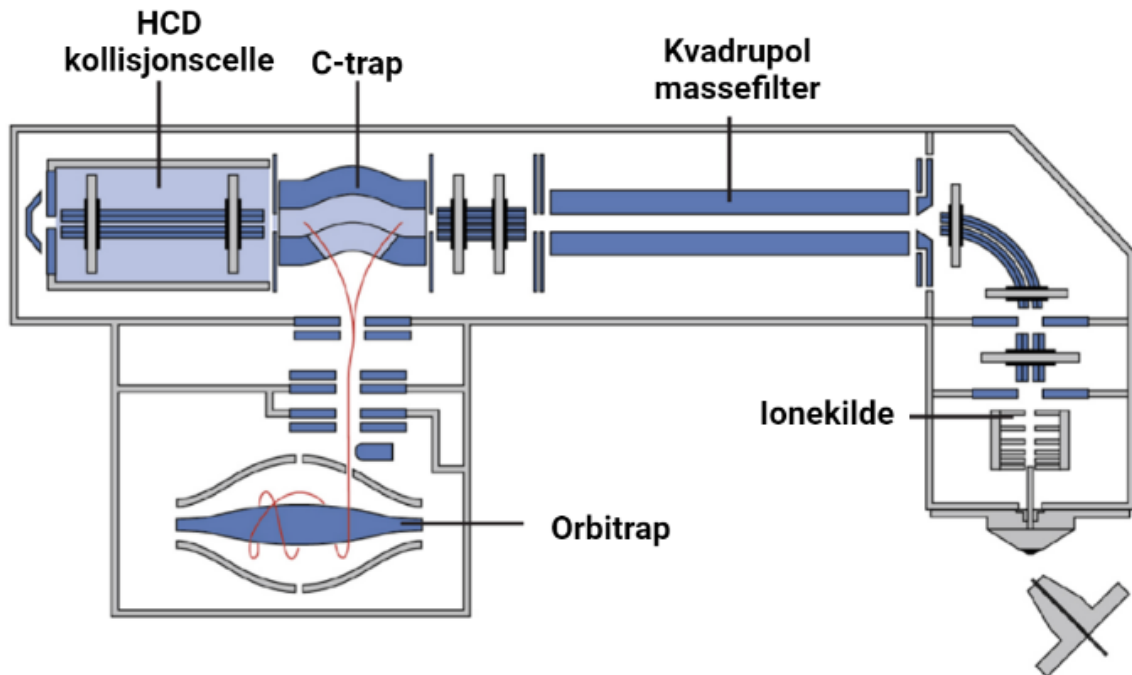
2.2.2 Masseanalysator

I massespektrometri blir det brukt flere ulike masseanalysatorer. Instrumentet i dette forsøket er en tandem-MS av Orbitrap-typen bestående av en kvadrupol, C-trap, Orbitrap og Higher-energy collisional dissociation (HCD), som er en fragmenteringsteknikk. Tandem MS, også kalt MS/MS, utføres i to trinn, MS1 og MS2. Et slikt MS-oppsett gir både massesammensetningen og strukturell informasjon av forbindelser, og brukes for identifikasjon og karakterisering av molekyler.

Q Exactive Orbitrap er kjent for å gi høy oppløsning, massenøyaktighet og følsomhet, som fungerer som en hybridteknikk. Ioniserte forbindelser fra ESI blir ledet til en kvadrupol som genererer et oscillerende elektrisk felt [29]. Kvadrupolen er plassert før Orbitrap-en og kan fungere som et filter for hvilke ioner som sendes videre til deteksjon i Orbitrap-en, MS2. Det oscillerende elektriske feltet selekterer ioner basert på deres m/z -verdi og tillater kun ioner med en bestemt m/z -verdi passere videre til Orbitrap-en [30].

Orbitrap-en består av en indre, sentral elektrode omgitt av en todelt elektrode. Langs den indre elektroden, vil ionene få en stabil og sirkulerende bevegelse frem og tilbake. Oscillasjonsfrekvensene til de forskjellige ioneslagene, er en funksjon av deres massetall. Ionene som selekteres, videreføres til en C-trap og fra C-trapen går de enten til Orbitrap-en for deteksjon eller til HCD-kollisjonscelle for fragmentering. Fra kollisjonscellen kan fragmentionene sendes tilbake til C-trapen og videre til selve Orbitrap-en. Når ionene beveger seg, induseres en strøm i de to ytre elektrodene som omgir ionefellen. Summen av bidragene fra de enkelte ionetyperne er summen av den totale, målte strømmen [23].

I tandem-MS er Data-Dependent Acquisition (DDA) brukt for innsamling av data. DDA-modusen omfatter alle peptider innenfor en bestemt m/z -signalintensitet fragmentert i tandem-MS. Massespektrometeret velger de mest intense ionene i MS1, hvor de deretter blir fragmentert og analysert i MS2 [31].



Figur 6: Oppsett av Q Exactive Orbitrap LC-MS/MS [32].

Videre i MS-en kan en utføre Fourier-transformasjon, der man kan bestemme oscillasjonsfrekvensene til ionene. Den totale strømmen, som oppstår av oscillasjonene, blir detektert og registrert av Orbitrap-detektoren. Hvert enkelt signal representerer de forskjellige ionene og deres oscillasjoner. Detektoren som har samlet opp signalene, overfører dette til datamaskinen ved hjelp av Fourier-transformasjon [23].

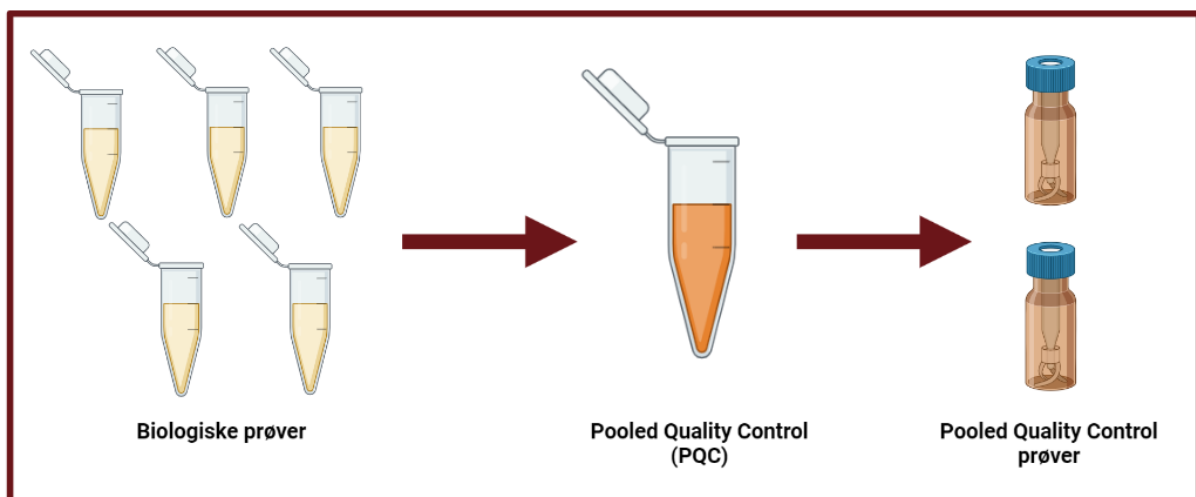
2.3 Kvalitetssikring

2.3.1 Pooled Quality Control – PQC

Kvalitetskontroll er essensielt i metabolomikk studier for å sikre at dataen som er hentet ut er nøyaktige og pålitelige. Kvalitetskontrolltiltakene innebærer de teknikkene og aktivitetene som brukes til å måle og rapportere kvalitetskravene etter datainnsamling. Pooled Quality Control prøver (PQC-prøver) innebærer å kombinere representative prøver fra flere individuelle prøver for å danne en sammensatt prøve som representerer den generelle kvaliteten eller ytelsen til den analytiske prosessen. Ved å analysere PQC-prøven sammen med individuelle prøver, kan en oppdage eventuelle systematiske feil eller variasjoner som kan oppstå under analysen [33].

I denne studien ble prøvematerialet fra alle deltakerne kombinert for å danne en sammensatt PQC-prøve. Totalt ble det opparbeidet to PQC-prøver, hvor den andre var en reserve i tilfelle den første ikke var tilstrekkelig. Gjennom den analytiske batchen vil disse replikatene bli jevnt fordelt. Dermed kan et enkelt mål for presisjon beregnes for hver metabolittfunksjon når en har kommet til slutten av databehandlingen [33].

Det er meget viktig at prøveoppbevaringen til PQC-prøvene og de biologiske prøvene behandles på en identisk måte for å kunne sikre at det resulterende presisjonsmålet gjelder for de biologiske prøvene og gir kvalitetskontroll for hele analysen. I tillegg så anbefales det å enten ha PQC-prøver i separate hetteglass og injisere fra hvert hetteglass, eller å ha et begrenset antall injeksjoner, som for eksempel maksimalt tre injeksjoner fra hvert enkelt hetteglass. Dette er viktig dersom prøven inneholder en stor mengde med organisk løsemiddel, da fordampning fra hetteglasset vil kunne resultere i at konsentrasjonen av metabolitter i PQC-prøvene kan endres over tid [33]. En generell måte å opparbeide PQC er vist i **Figur 7**.



Figur 7: Visualisering av hvordan generelle PQC-prøver fremstilles fra de biologiske prøvene.

For å utføre en systematisk sjekk av datakvaliteten kan en sette opp et prinsippal komponent analyse plott (PCA-plott) av det komplette datasettet. Det er forventet at et typisk PCA-plott for et datasett som er av høy kvalitet, skal kunne visualisere at PQC-prøvene er samlet sammen i tette klynger i forhold til den totale variansen mellom de biologiske prøvene.

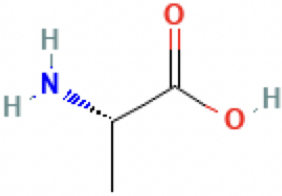
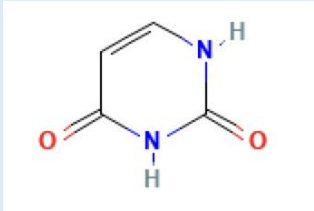
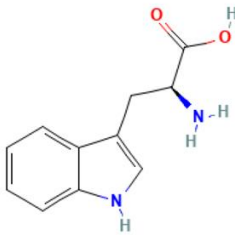
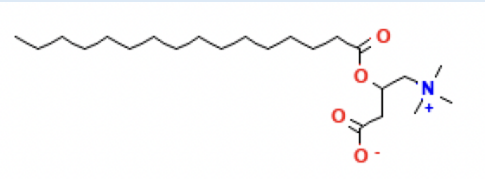
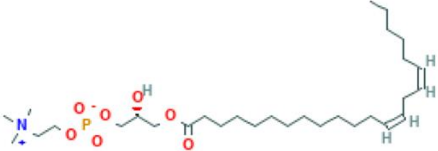
2.3.2 System Suitability Test – SST

System Suitability Test (SST) er en testmetode som brukes for å evaluere ytelsen til et analyseinstrument eller en metode. Under validering av en metode bør det blant annet være avklart å minimere tapet av biologiske prøver når de passerer gjennom prosessen fra prøveopparbeidelse til databehandling. Her kan en SST benyttes for å sjekke at ikke noe har endret seg vesentlig siden valideringen [33].

En annen viktig del av SST er å sikre at resultatene som produseres av instrumentene eller metoden er innenfor akseptable grenser for nøyaktighet og presisjon. Dette kan involvere å sammenligne resultatene fra en prøve med en kontrollprøve, eller ved å sammenligne resultater fra flere forskjellige metoder. Ved å utføre en slik kvalitetskontroll kan laboratoriet identifisere eventuelle problemer eller feil, og ta nødvendige tiltak for å løse dem. I tillegg er SST viktig for å garantere at instrumentene eller metoden som brukes, er kvalifisert til å oppdage små endringer i prøvene som analyseres. Dette er spesielt viktig når en skal analysere mange forskjellige prøver over en tidsperiode, da små endringer i prøvene kan ha stor betydning [34].

SST er derfor en viktig del av kvalitetssikringen, og er avgjørende for å sikre at laboratoriene kan produsere pålitelige og presise resultater som kan brukes til å støtte kliniske beslutninger og diagnostikk. **Tabell 1** viser de ulike forbindelsene som SST-en, som ble brukt i denne analysen, inneholder.

Tabell 1: Molekylnavn, struktur og molekylformel til alle analyttene som SST inneholder, og som er brukt i alle forsøk i denne oppgaven. Konsentrasjonen til SST-løsningen er 0,1 μM . Alle verdier er hentet fra PubChem [35].

Molekylnavn	Struktur	Molekylformel
Alanin	 <p>The structure shows a central carbon atom bonded to a methyl group (represented by a vertical line), an amino group (NH₂), and a carboxylic acid group (COOH). The amino group is shown with a dashed bond to the central carbon, indicating its stereochemistry.</p>	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$
Uracil	 <p>The structure is a six-membered heterocyclic ring with two nitrogen atoms and two carbonyl groups (C=O) at the 2 and 4 positions.</p>	$\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$
Tryptofan	 <p>The structure consists of an indole ring system attached to a side chain that ends in an amino acid group (CH₂-CH(NH₂)-COOH).</p>	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$
Acylcarnitin C16	 <p>The structure shows a long hydrocarbon chain (16 carbons) attached to a carnitine moiety. The carnitine part includes a quaternary ammonium group (N⁺) and a carboxylate group (COO⁻).</p>	$\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{NO}_4$
Lyso-fosfatidylkolin (LysoPC)	 <p>The structure shows a lysophosphatidylcholine molecule, consisting of a glycerol backbone with one fatty acid chain and one phosphate group linked to a choline head group.</p>	$\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{NO}_7\text{P}$

2.4 Dataanalyse og statistikk

2.4.1 Prinsipal Komponent Analyse – PCA

Prinsipal komponent analyse (PCA) reduserer kompleksiteten på multidimensjonale data samtidig som den brukes for å vise trender og mønstre. Den gjør dette ved å konvertere dataene til færre dimensjoner ved å innføre såkalte «prinsipale komponenter» (PC-er). PCA gir en dimensjonsreduisering som gjør det enklere for å visualisere vektorer med størst variasjon. Dette vil gi den beste oversikten ved å benytte et begrenset antall PC-er. Den første PC-en er selektert for å vise hvilken vektor der det er størst spredning, og PC 2 velges for å visualisere den nest største spredningen. I utgangspunkt er de andre PC-ene også valgt på samme måte, men de har i tilleggskrav at de ikke er korrelert med alle tidligere PC-er [36].

Hvert punkt i et PCA-plott fremstiller én prøve. Avstanden mellom punktene representerer variasjonen mellom dem. Punkter som ligger i nærheten av hverandre i et PCA-plott er mer like hverandre enn punkter som ligger langt fra hverandre. PCA-plott kan derfor brukes til å se etter mønstre i et datasett og for å angi grupper av datapunkter som er like eller ulike hverandre [37].

2.4.2 Vulkanplott

Vulkanplott brukes ofte for å visualisere statistiske resultater av alle typer omics-data. I hovedsak så benyttes plottet for å visualisere forskjellen av metabolitter eller gener mellom to grupper eller to tilstander. X-aksen representerer fold endringen (FC) mellom to forskjellige tilstander, mens y-aksen representerer den negative logaritmen av P-verdien, som et mål på statistisk signifikans [38].

I metabolomikken brukes plottet til å sammenligne metabolittnivåer ved ulike eksperimentelle og/eller biologiske variasjoner. Alle metabolitter vil vises som punkter i diagrammet, og graden av endring og eventuell signifikans i forhold til endringer vil også fremgå i plottet. Jo lenger et punkt er plassert på x-aksen, desto høyere er fold-endringen. Metabolitter som er økt i den ene tilstanden vil være plassert på den høyre delen av plottet, mens metabolitter som er redusert vil da være plassert i den venstre delen av plottet.

Punktene som er lokalisert i midten av plottet er metabolitter som ikke er signifikant forskjellig uttrykt mellom de to tilstandene [38].

Ved å bruke et vulkanplott i metabolomikk kan en identifisere signifikante forskjeller i metabolitter mellom to forskjellige tilstander, som for eksempel i dette forsøket var å sette opp tidspunktet før trening og tidspunktet rett etter trening, og dermed få nyttig informasjon om biologiske prosesser.

I dette forsøket så velges det tilstand basert på hvilket tidspunkt en ønsker å sammenligne metabolittene i. I tillegg ble terskelen for P-verdi satt til å være 0,05.

2.4.3 Box Whisker plott

Et Box whisker plott er en enkel måte å fremstille variasjon i et sett med data. Det er totalt fem hovedkomponenter i et box whisker der alle bidrar til å representere fem kjennetegn ved et datasett: minimumsverdi, første kvartil, median, tredje kvartil og maksimumsverdi [39].

Et box whisker plott består som regel av en vertikal linje, som strekker seg fra en minimumsverdi til en maksimumsverdi, og en boks. Den nedre siden av boksen viser første kvartilen (Q1), mens den øvre siden av boksen viser tredje kvartilen (Q3). Linjen som krysser boksen er da andre kvartilen (Q2), ofte kjent som medianen [39].

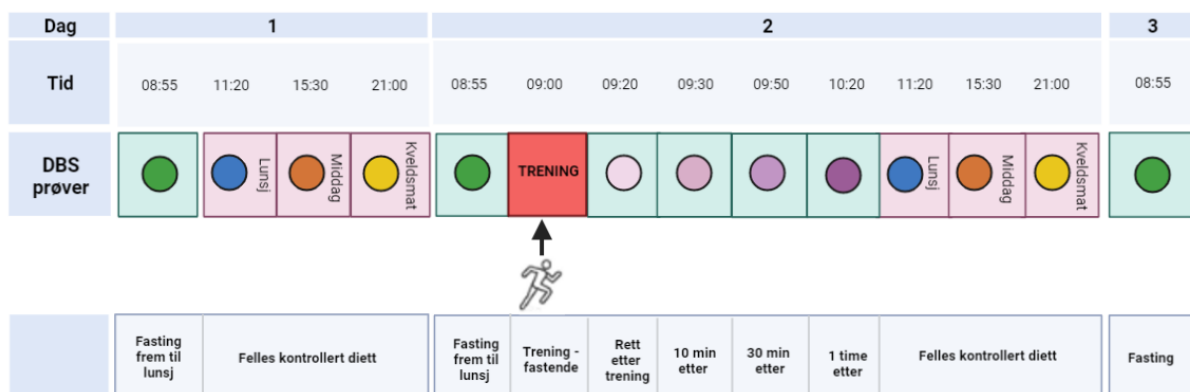
Box plottet er veldig effektiv og enkel å lese, da den gir en oppsummering av data fra flere kilder og visualiserer dette i en enkel graf. Dette plottet er spesielt nyttig når en skal se på variasjoner i dataene og for å se trender. I metabolomikk er box whisker plottet ganske nyttig for å kunne identifisere potensielle biomarkører som kan brukes til diagnostisering av eventuelle sykdommer.

2.5 Forsøksdesign

2.5.1 Forsøksplan

Det ble sendt inn en søknad til Regionalt Etisk Komite for medisinsk og helsefaglig forskning med formål om å undersøke det normale metabolomet. Samtykkeskjemaet som ble utlevert til deltakerne, finnes i **Vedlegg A**.

Det ble først laget et studiedesign, som kan defineres som en plan for hvordan et forsøk skal gjennomføres for å besvare spesifikke forskningsspørsmål. Studiedesignet som ble lagd og brukt i forsøket er presentert i **Figur 8**.



Figur 8: Studiedesign som inkluderer innsamling av DBS-prøver på tretten ulike tidspunkter over en periode på tre dager, markert med forskjellige fargekodede sirkler. Totalt ble det samlet inn tre fastende prøver og seks prøver under kontrollert diett. Et ekstra sett med fire prøver som ble tatt i løpet av den første timen etter trening ble samlet inn fra treningsgruppen.

Det var avgjørende at alle deltakerne skulle ha en identisk diett og at blodprøver ble tatt på samme tidspunkt. Dette var for å kunne skrelle bort alt mulig annet variasjon knyttet til kosthold, som gjorde at dersom det oppstod forskjeller så var det knyttet til trening og ikke noe annet. Forsøket strakte seg over tre dager, og studiedesignet viste tidspunktene for blodprøvetaking, fasteperioder, treningsøkt og måltider.

I løpet av det første forsøksdøgnet var opplegget identisk for både treningsgruppen og kontrollgruppen. Det ble tatt en prøve etter faste over natten, og tre blodprøver ble tatt under en kontrollert diett. Andre forsøksdøgn skilte seg ut mellom treningsgruppen og

kontrollgruppen, der treningsgruppen måtte gjennomgå en treningsøkt, mens kontrollgruppen hadde en identisk dag som det første forsøksdøgnet. Det andre forsøksdøgnet startet med at alle tok en prøve etter faste over natten. Deretter utførte treningsgruppen en treningsøkt som utgjorde 9 minutter og 40 sekunder, etterfulgt av blodprøver som ble tatt ett minutt etter trening, ti minutter etter, en halvtime etter og én time etter. Ettersom kontrollgruppen ikke gjennomførte trening, slapp de å ta disse blodprøvene. Resten av dagen var identisk med det første forsøksdøgnet. På det tredje og siste forsøksdøgnet ble det kun tatt én prøve etter faste over natten.

For å sammenligne normal-metabolomet med treningsmetabolomet, og om treningen hadde en vedvarende effekt, ble forsøket utført over en periode på tre dager.

2.5.2 Diettplan

I dette forsøket ble det bestemt at alle de ni friske frivillige, altså fem treningspersoner og fire kontroller, skulle ha en felles diett. Dietten ble nøye sammensatt for å imøtekomme alle deltakernes ernæringsbehov, allergier og preferanser.

Under utarbeidelsen av en felles diettplan ble lagt stor vekt på å unngå å indusere en katabolsk tilstand blant deltakerne, ettersom dette kunne ha påvirket metabolismen. Som følge av dette var det tillatt for deltakerne å spise seg mette, istedenfor å ha begrensninger på mengden mat per måltid. Den endelige diettplanen som ble utarbeidet og brukt finnes i **Vedlegg B i Tabell B.1**, og var den samme for alle forsøksdagene. En oversikt over når hvert måltid ble inntatt, er vist i **Vedlegg B i Tabell B.2**.

2.5.3 Prøvetaking

Filterkort som ble brukt i forsøket var av typen Whatman 903 Protein Saver-card og hentet fra Cytiva (Chicago, IL, USA).

Deltakerne ble instruert til å vaske hendene med varmt vann, skylle godt og tørke dem. Deretter fjernet de spissen på lansetten ved å vri på den, og presset lansetten mot siden av fingertuppen før de trykket på utløseren. Den første bloddråpen som kom ut, ble kastet. De ventet til det dannet seg en stor dråpe blod før de forsøkte å plassere én enkelt dråpe

innenfor hver sirkel på filterkortet uten å berøre papiret. I noen tilfeller opplevde deltakerne at det var nødvendig med flere stikk og applikasjoner på papiret.

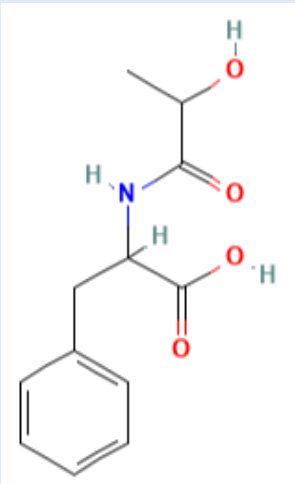
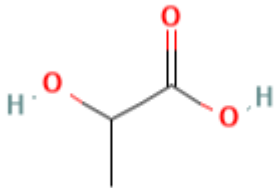
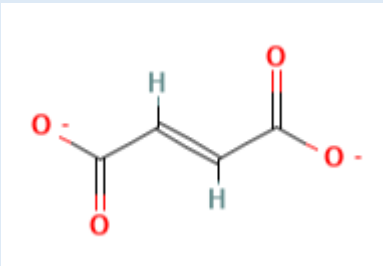
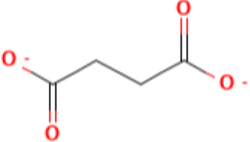
Filterpapiret ble deretter tørket i 3-4 timer ved romtemperatur, ved at de ble liggende flatt og unngikk direkte sollys. Det tørkede filterkortet ble plassert i en forseglet plastpose med Silika og oppbevart i en fryser på -80 grader til de skulle opparbeides.

2.5.4 Relevante metabolitter knyttet til metabolske endringer ved trening

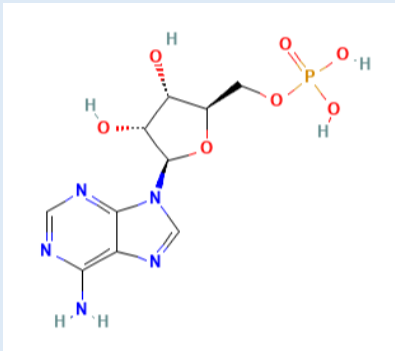
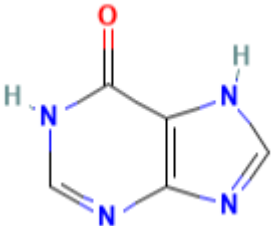
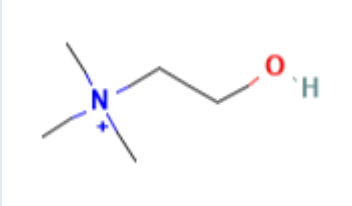
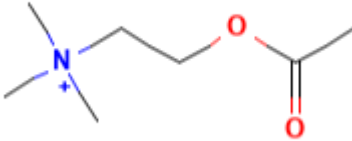
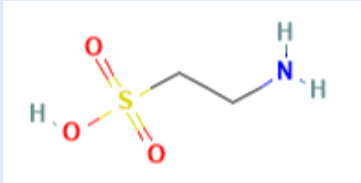
Basert på litteratursøk så har det blitt lagt vekt på en liste med metabolitter som finnes i

Tabell 2. Disse metabolittene ble forventet å vise en endring i nivåer knyttet til trening.

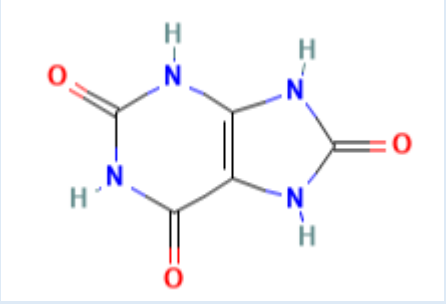
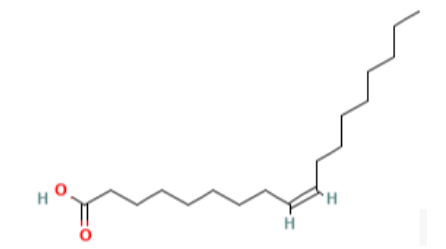
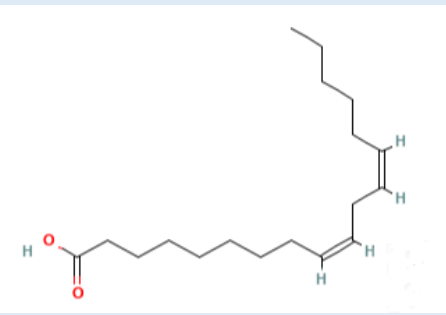
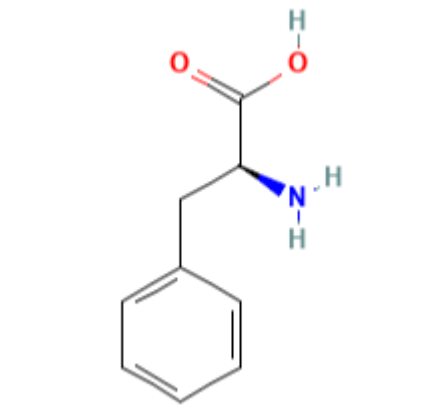
Tabell 2: Molekylformel, struktur, monoisotopisk masse og logP verdier for forhåndsbestemte metabolitter av interesse for treningseffekter. Alle verdier er hentet fra PubChem [35].

Molekylnavn	Struktur	Molekyl formel	Monoisotopisk masse	logP
Laktoyl-fenylalanin – Lac Phe [40]		$C_{12}H_{15}NO_4$	237.10010796	0.1
Laktat [40]		$C_3H_6O_3$	90.031694049	-0.7
Fumarat [40]		$C_4H_4O_4$	113.99530854	1
Succinat [40]		$C_4H_6O_4$	116.01095860	0.7

Tabell 2, fortsettelse: Molekylformel, struktur, monoisotopisk masse og logP verdier for forhåndsbestemte metabolitter av interesse for treningseffekter. Alle verdier er hentet fra PubChem [35].

Molekylnavn	Struktur	Molekyl formel	Monoisotopisk masse	logP
Adenosine-5'-monofosfat – AMP [41]		$C_{10}H_{14}N_5O_7P$	347.06308480	-3.5
Hypoxantin [41]		$C_5H_4N_4O$	136.03851076	-0.5
Kolin [42]		$C_5H_{14}NO^+$	104.107539070	-0.4
Acetylkolin [42]		$C_7NH_{16}O_2^+$	146.118103753	0.2
Taurin [43]		$C_2H_7NO_3S$	125.01466426	-4.1

Tabell 2, fortsettelse: Molekylformel, struktur, monoisotopisk masse og logP verdier for forhåndsbestemte metabolitter av interesse for treningseffekter. Alle verdier er hentet fra PubChem [35].

Molekylnavn	Struktur	Molekyl formel	Monoisotopisk masse	logP
Urinsyre [41]		C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	168.02834000	-1.9
Oljesyre [41]		C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.255880323	6.5
Linolsyre [41]		C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.240230259	6.8
Fenylalanin [40]		C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.078978594	-1.5

3. Eksperimentelt

3.1 Kjemikalie- og materialeliste

3.1.1 Kjemikalier

- Metanol, MeOH fra Rathburn Chemicals (Walkerburn, Scotland), Grad: LC/MS
- Maursyre, fra Thermo Scientific, Grad: LC/MS
- Lac-Phe standard, Cayman Chemical Company
- Pierce LTQ Velos ESI Positive Ion kalibreringsløsning
- Pierce ESI Negative Ion kalibreringsløsning
- Vann av type 1 (>18 MΩ cm), fra MilliQ ultrapure water purification system (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

3.1.2 Utstyr

- Automatpipette, Fisherbrand Elite (2-20 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)
- Pipette, SARSTEDT AG & Co. KG (20 µL, 200 µL, 1000 µL)
- Whirlmixer, Heidolph REAX top, KEBO Lab AS
- Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Puncher – McGill (Advantus Corp., Jacksonville, FL, USA)
- HPLC-hetteglass - La-Pha-pack (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Eppendorfrør - Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
- Filterpapir DBS – Whatman 903 Protein Saver cards

- Væskekromatografi (LC) fra Thermo Scientific:
 - Dionex Ultimate 3000 UHPLC
 - Kolonne: Pursuit XRs Diphenyl (250mm x 2,0 mm, 3,0 µm)
 - Autossampler

- Massespektrometri (MS) fra Thermo Scientific:
 - Q Exactive Orbitrap med ESI

3.1.3 Materialer

En oversikt over matvarer som ble benyttet i forsøket for deltakerne i en periode på tre dager, er vist i **Vedlegg B i Tabell B.1**.

3.2 Løsninger

3.2.1 Ekstraksjonsløsning

Det ble brukt en ekstraksjonsløsning i forsøket for å ekstrahere så mange forbindelser som mulig av filterkortene. Ekstraksjonsløsningen inneholdt 80% Metanol med 0,1 % maursyre. Løsningen ble lagret i kjøleskapet på 4 °C før bruk. Utløpstiden for ekstraksjonsløsningen er opptil tre til seks måneder, men dersom en ser at løsningen begynner å dele seg, må det lages ny.

3.2.2 Kalibreringsløsninger

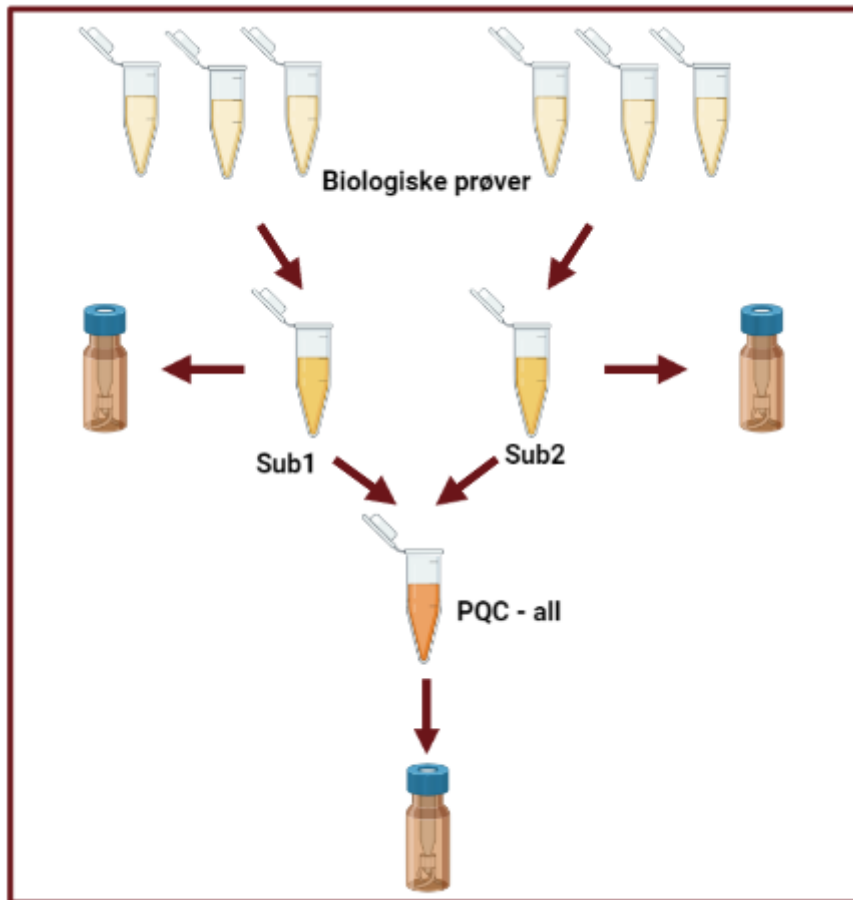
Pierce ESI Negativ Ion kalibreringsløsning og Pierce LTQ Velos ESI Positiv kalibreringsløsning ble hentet fra Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) og oppbevart i fryser på -20 °C.

3.3 Prøveopparbeidelse av DBS

Ved hjelp av en manuell puncher, ble en punch tatt fra midten av blodflekken på filterkortet. Punchen ble deretter overført til separate eppendorfrør. Til hvert eppendorfrør ble det tilsatt 100 µL ekstraksjonsløsning (se **Kapittel 3.2.1**). Deretter ble rørene blandet i 45 minutter ved 45 °C og 700 omdreininger per minutt (rpm) ved hjelp av en Thermomixer Comfort. Videre ble 30 µL fra hvert eppendorfrør overført til separate HPLC-hetteglass med innsettingsglass og kork. Disse ble blandet ved hjelp av en Whirlmixer.

For å lage PQC-prøver, ble det først laget to samlede prøver i hvert sitt eppendorfrør kalt for Sub1 og Sub2. Sub1-prøven bestod av 30 µL av alle prøvene som ble tatt etter trening fra forsøksdag 2 fra hver deltaker. Sub2-prøven bestod av 30 µL fra alle de resterende prøvene. Videre så ble 30 µL fra Sub1 og 30 µL fra Sub2 overført til et separat eppendorfrør kalt for PQC-all. Denne prøven ble blandet sammen ved hjelp av en Whirlmixer. Til slutt ble 30 µL fra Sub1, Sub2 og PQC-all prøvene overført til hvert sitt HPLC-hetteglass med innsettingsglass og

kork. **Figur 9** viser en visualisering av de biologiske prøvene, Sub1 og Sub2 prøvene og PQC-prøven.



Figur 9: Prøveopparbeidelse av de biologiske prøvene til fem forsøkspersoner, Sub1 og Sub2 prøvene og PQC-prøven. Sub1 besto av alle prøvene tatt etter treningen fra dag to, 09:20 til 21:00, og Sub2 består av de resterende prøvene.

Alle prøvene i HPLC-hetteglass ble plassert i autosamler-stativet og holdt ved 4 °C før analysen ble satt i gang.

3.4 HPLC-betingelser

HPLC-instrumentet som ble brukt i dette forsøket var et Dionex Ultimate 3000 Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC) system koblet til et Q Exactive Orbitrap massespektrometer, der begge er fra Thermo Scientific. De instrumentelle innstillingene som ble brukt er basert på en etablert metabolomikk-metode [41]. Innstillingene for

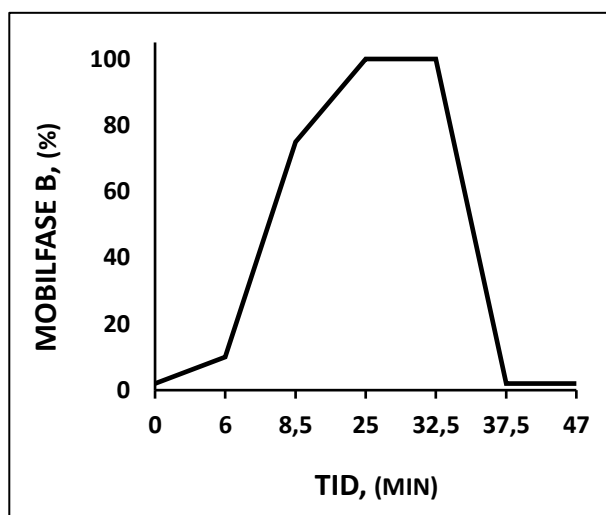
væskekromatografen er vist i **Tabell 3**. Kolonnen som ble brukt var en Pursuit XR's Diphenyl kolonne (250 x 2,0 mm, partikkelstørrelse 3 µm) fra Agilent Technologies (Santa Clara CA, USA).

Tabell 3: Felles analytiske betingelser for HPLC-instrumentet for alle forsøk som er utført i denne oppgaven.

Parameter	Setting
Mobilfase A	Vann + 0,1 % FA
Mobilfase B	MeOH + 0,1 % FA
Gradient	Se Tabell 4 og Figur 10
Injeksjonsvolum	2 µL
Kolonnetemperatur	30 °C
Mobilfasehastighet	300 µL/min
Likevektsinnstillingstid	10 min
Total tid for hver analyse	47,5 min

Tabell 4: Mobilfasegradienten for alle forsøk.

Tid (min)	Mobilfase B (%)
0	2
6	10
8,5	75
25	100
32,5	100
37,5	2
47	2



Figur 10: Mobilfasegradienten for alle forsøk.

3.5 MS-betingelser

Betingelser for massespektrometeret og elektroprayonekilden er gitt i **Tabell 5** og **Tabell 6**. Disse betingelsene gjelder for alle forsøkene som er utført i oppgaven. Alle prøvene er analysert med både positiv og negativ ionisering.

Tabell 5: Felles analytiske betingelser for massespektrometeret for alle forsøk som er utført i denne oppgaven.

Parameter	Setting
Skanningstype	Full MS Data dependent acquisition (DDA), Top 5
Dynamisk skanningsområde (m/z)	80-1200
Polaritet	Positiv og negativ
Oppløsningsevne	Full MS: 70 000 DDA Top 5: 17 500
Mikroskanninger	1
“Lock masses”	Av
Maksimal injeksjonstid (ms)	Full MS: 250 DDA Top 5: 100
“Automatic gain control target value”	Full MS: 1e6 DDA Top 5: 5e5
Trinnvis normalisert kollisjonsenergi (V)	20, 50, 80
Likevekstinnstillingstid	10
Total tid for hver analyse (min)	32,5

Tabell 6: Felles analytiske betingelser for elektroprayionekilden som er brukt i denne oppgaven.

Parameter	Setting
“Sheath gas” (N ₂) strømningshastighet	40
Hjelpegass (N ₂) strømningshastighet	10
“Sweep gas” (N ₂) strømningshastighet	2
Kapillær temperatur (°C)	250
“S-lens RF level”	50
Hjelpegass varmetemperatur (°C)	300
Elektronspøy spenning (kV)	3.50
Elektronspøy nål posisjon	C

3.6 Programvare

Til å hente inn data og prosessering ble det brukt flere forskjellige programvarer, der alle programvarene er fra Thermo Scientific. For datainnsamling og prosessering så ble det brukt Xcalibur (versjon 4.2.47). Thermo Scientific SII for Xcalibur (versjon 4.2.47) ble brukt for å kontrollere det kromatografiske instrumentet. For kalibrering av massespektrometri-instrumentet og kontroll av massespektrometriske parametere ble det brukt Tune (versjon 2.11). Massekalkulator i Tune ble brukt for å beregne de nøyaktige massene til de ulike forbindelsene. FreeStyle (versjon 1.6.75.20) ble benyttet for å få opp visning av kromatogrammer og massespektre for å få toppdeteksjon og toppintegrasjon. Compound Discoverer (versjon 3.3.1.1111) ble brukt til statistisk analyse, databehandling og biblioteksøk (mzCloud, ChemSpider, Metabolica, mzVault og Predicted Compositions).

4. Resultater og diskusjon

Dette forsøket har gått ut på å påvise biomarkører knyttet til metabolske endringer i treningsmetabolomet. Dette ble gjort ved å benytte en allerede etablert LC-MS/MS-metode til analyse av metabolomet. For å oppdage endringer i metabolomet, ble DBS-prøver fra fem friske frivillige deltakere analysert før og etter deltagelse i en intensiv treningsøkt.

Det ble i utgangspunkt basert på minimum akseptkriterier for identifikasjon av forbindelser som vanligvis brukes i LC-MS global metabolomikk [41]. Kriteriene som ble brukt for MS-identifikasjon var at massenøyaktigheten måtte være ± 5 ppm (andeler per million) for den nøyaktige massen til molekylionet eller for en spesifikk addukt, og at den detekterte toppen måtte ha et toppareal høyere enn 10^4 a.u. Denne grenseverdien ble satt basert på erfaring, og på grunn av at topper med lavere toppareal enn 10^4 a.u. kan skyldes bakgrunnsstøy og ikke nødvendigvis er et tegn på tilstedeværelsen av en metabolitt.

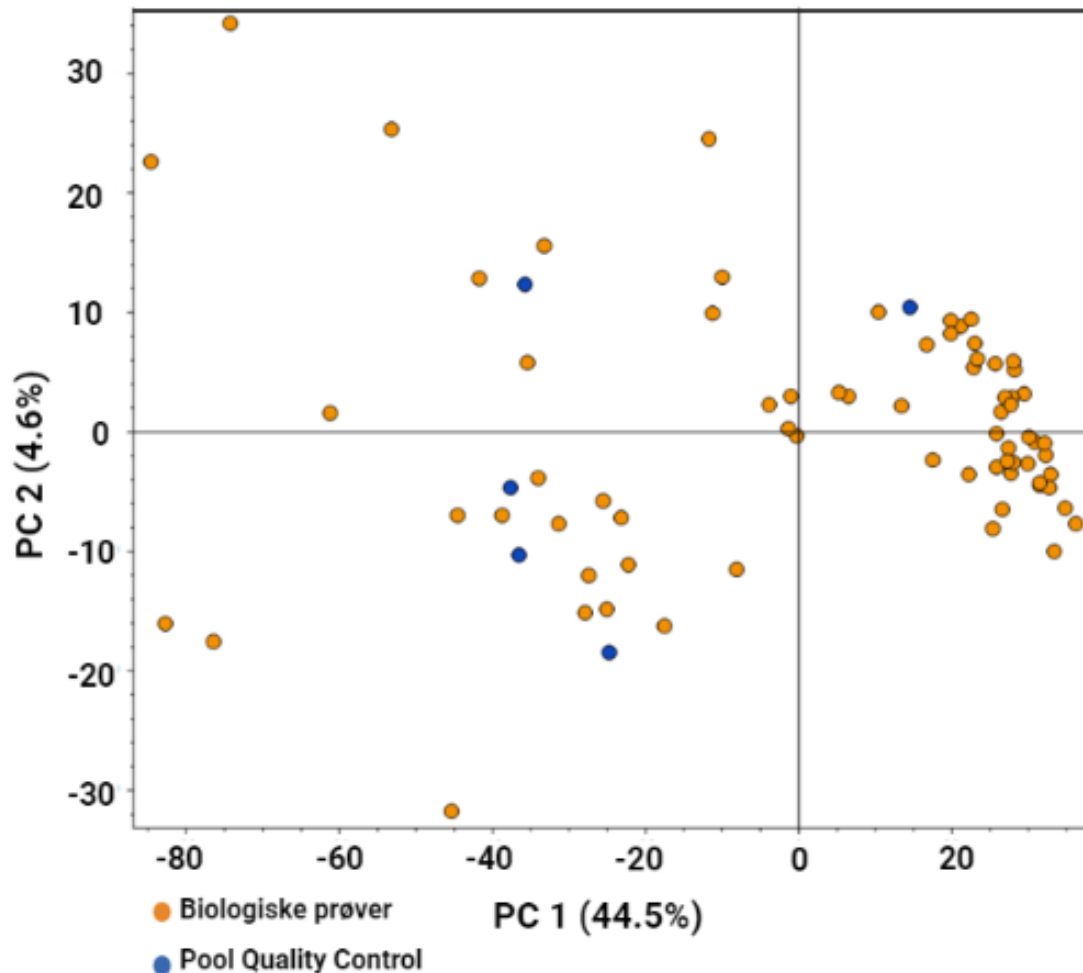
Det ble spesifikt fokusert på en utvalgt liste med metabolitter (se **Tabell 2**) under uthenting av resultater. Disse metabolittene er hentet fra andre artikler der de ble funnet å vise enten en økning eller reduksjon i mengde etter trening.

Grunnet mangel på kveldsprøven (21:00) fra dag 2 til forsøksperson TC så inneholder ikke resultatene denne prøven til TC. I alle grafer så er denne verdien til TC satt til å være null. Alternativt kunne verdien vært satt til et gjennomsnitt av de tilsvarende verdier hos de andre i samme gruppe på samme tidsperiode, eller resultatet kunne vært utelatt om det enkelt lot seg gjøre.

Prosessering for negativ ionisering mislyktes. Det medførte at alle resultater hentet fra Compound Discoverer kun er fra positiv ionisering. Alle grafer som er hentet ut fra FreeStyle vises derimot både for positiv og negativ ionisering.

4.1 Kontroll av PQC-prøvenes kvalitet

De biologiske prøvene, tatt fra de friske frivillige deltakerne, ble analysert i LC-MS/MS og dataen ble prosessert til å lage et PCA-plott. Resultater av den første analysen kan observeres ved å se på plottet i **Figur 11**.



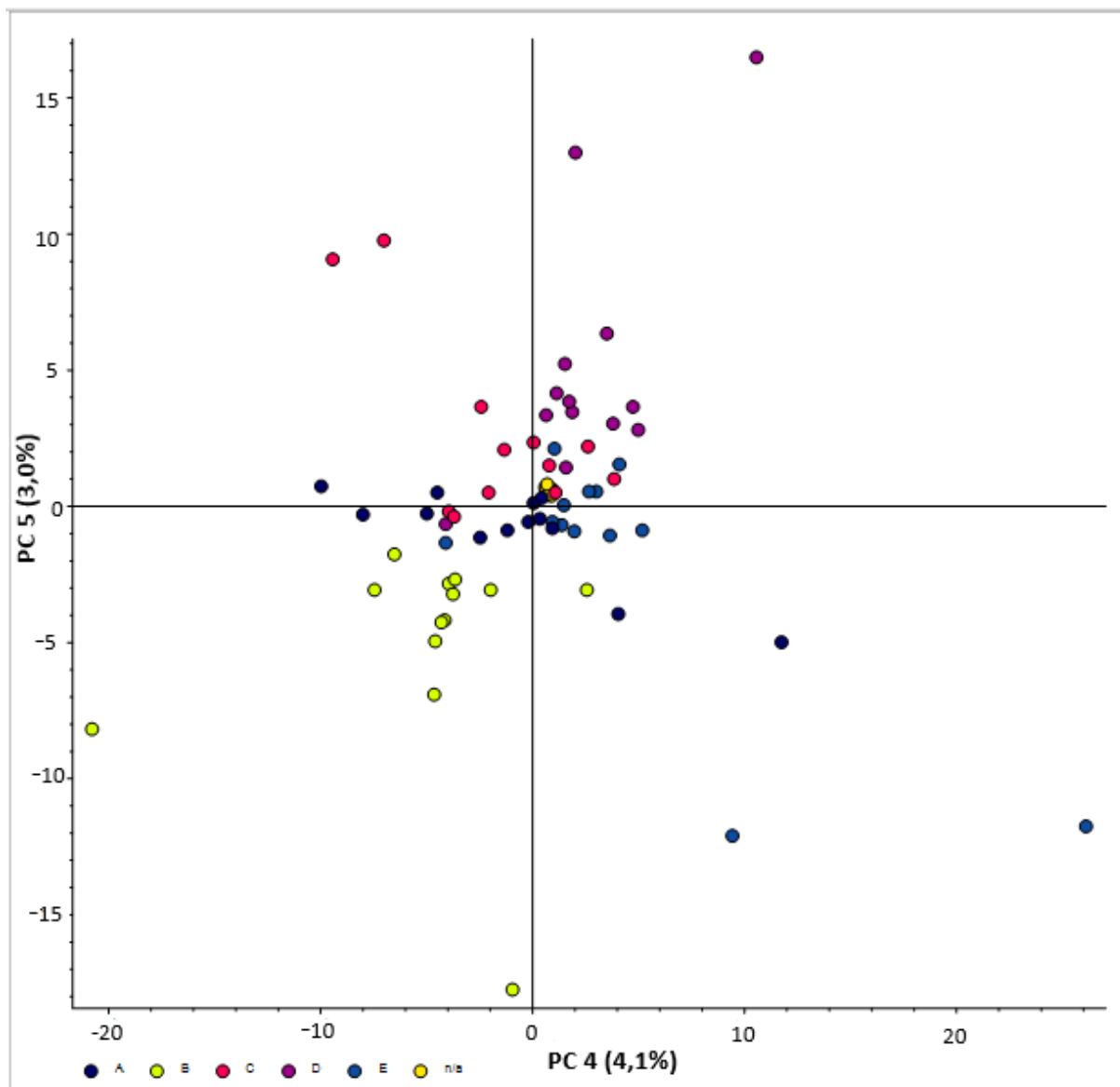
Figur 11: PCA-plott av tørkede blodflekker (DBS) fra friske frivillige deltakere i positiv ionisering. Her kan PQC-prøver observeres som blå punkter og de biologiske prøvene observeres som oransje punkter. Resultat er hentet fra Compound Discoverer.

For at resultatene fra analysen skal være fornuftige, må PQC-prøvene være samlet sammen i plottet nær origo. Dette er fordi PQC-prøvene inneholder en andel fra hver biologisk prøve. PQC-prøvene representerer derfor gjentatte analyser av samme prøvemateriale, og således skal de ligge samme sted i plottet. Siden de representerer et gjennomsnitt av alle prøvene, bør PQC-prøvene ligge sentrert i eller nær origo. Dersom disse prøvene ikke er samlet, tyder det på dårlig kvalitet på analysen, eller at det er svært liten forskjell på de ulike prøvene i

forsøksgruppen. Dersom det er stor spredning på PQC-prøvene, vil det også medføre en spredning i de biologiske prøvene ettersom de biologiske prøvene enten blir opp- eller ned-korrigert etter PQC-prøvene.

Ved å se på **Figur 11** kan det tydelig ses at PQC-prøvene, de blå punktene, er spredt utover i plottet. Dette viser at ønsket om et representativt resultat ikke er oppnådd, og det ble dermed konkludert å kjøre en ny analyse med ny prøveopparbeidelse.

PCA-plottet til den nye analysen med ny prøveopparbeidelse, som vist i **Figur 12**, presenterer fine resultater som en kan bruke til videre tolkning. PQC-prøvene, de gule punktene, ligger svært godt samlet i sentrum i PCA-plottet. Dette betyr at det er mye mindre spredning som følge av analytisk variasjon i biologiske prøver i denne kjøringen enn prøvene fra første analyse (**Figur 11**).



Figur 12: PCA-plott av DBS-prøver fra friske frivillige deltakere i positiv ionisering. Her kan PQC-prøver observeres som gule punkter som er meget tett sentrert nær origo. De biologiske prøvene er farget etter deltakere. Plottet er resultater fra andre gang prøvene ble opparbeidet. Resultat er hentet fra Compound Discoverer.

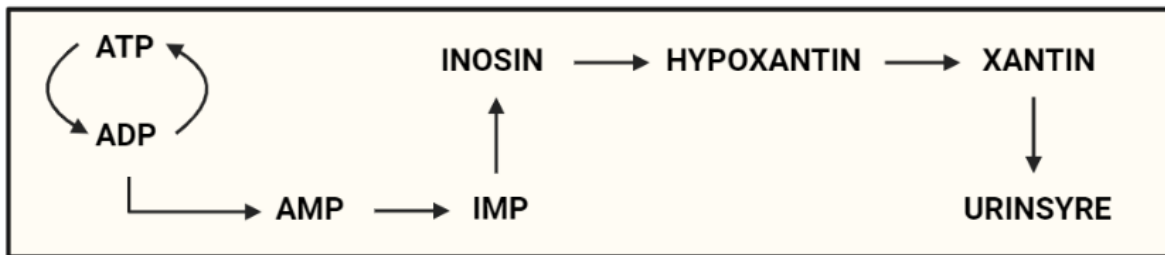
En annen observasjon fra **Figur 12**, er at prøvene er gruppert etter personer. Det ser man ved at hver enkelt farge er nærmere hverandre enn å være blandet med andre farger. Dette betyr at hver deltaker er globalt sett mest lik seg selv, selv om fem av personene har gått gjennom en intensiv trening og alle har hatt felles diett.

4.2 Treningsmetabolomet

4.2.1 Metabolitter knyttet til adenin-nukleotid-katabolisme som blir påvirket av trening

En stor del av dette forsøket omfatter adenin-nukleotid-katabolismen. Den metabolske veien fra adenosin-5'-trifosfat (ATP) til urinsyre er kjent for å gå gjennom katabolske endringer under trening [44].

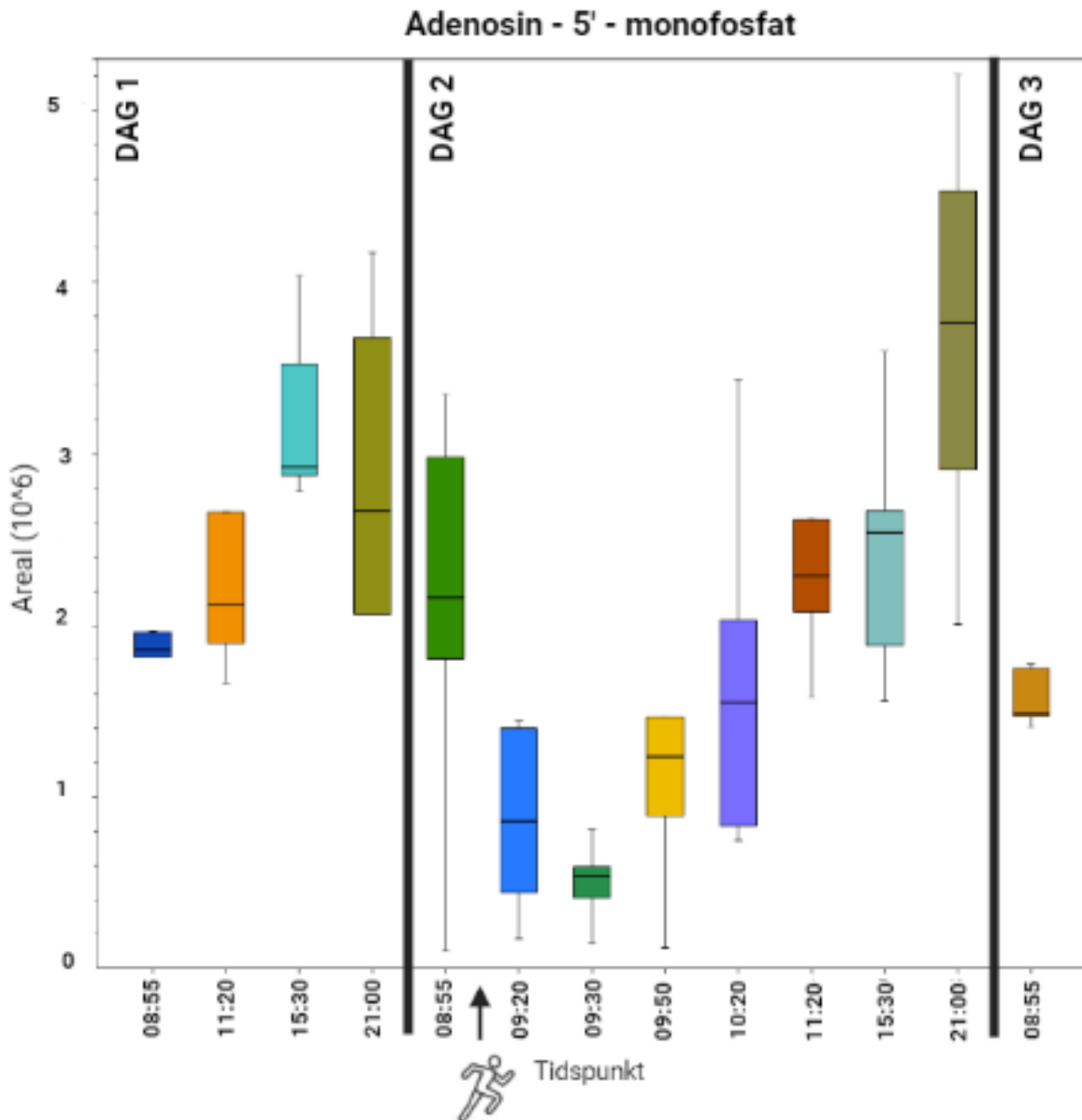
Ved høyintensiv trening vil det oppstå en ubalanse mellom tilbud og etterspørsel av ATP, som fører til en hydrolyse av ATP til adenosin-5'-difosfat (ADP) og adenosin-5'-monofosfat (AMP). Under denne tilstanden omdannes AMP av AMP-deaminase til inosinmonofosfat (IMP). Deretter kan IMP regenereres til AMP via purin-nukleotidsyklusen eller kataboliseres videre til hypoxantin. Ved hjelp av enzymer blir hypoxantin omdannet til xantin og urinsyre som er de siste produktene i denne katabolismen [44], som vist i **Figur 13**.



Figur 13: Metabolske veien av adenin-nukleotid-katabolisme. Katabolismen slutter med produktene hypoxantin, xantin og urinsyre, og skilles ut av urinen. Figuren er hentet fra [44].

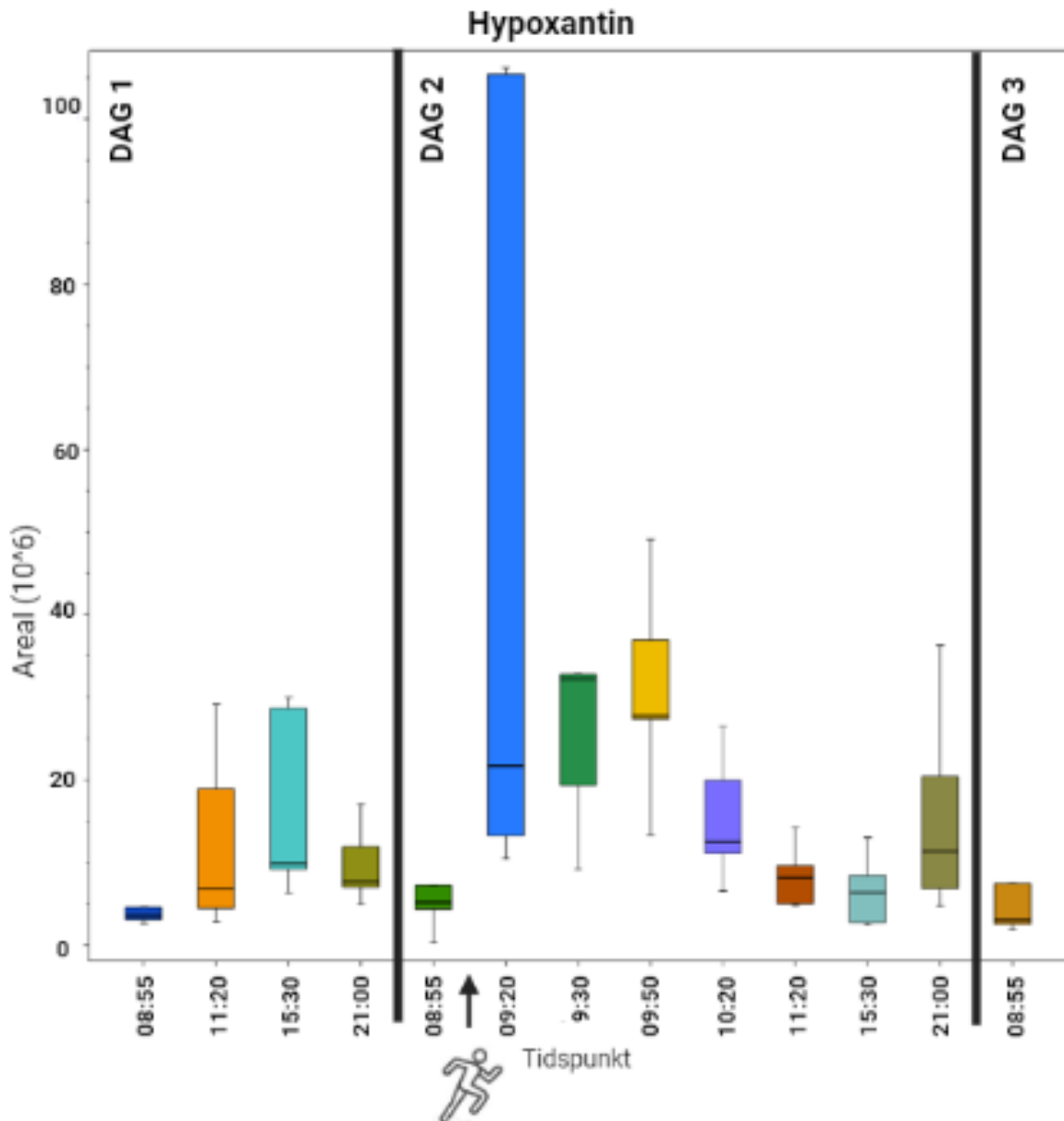
Ut ifra denne katabolismen hadde en teori om at AMP, hypoxantin og urinsyre ville få metabolske endringer knyttet til treningen.

Mengden AMP ble funnet å være mindre av i prøver som ble tatt rett etter trening, som en kan se i **Figur 14**. Basert på tidligere litteratur [41] stemmer det med teorien. En ser at AMP synker kraftig rett etter trening og enda mer 10 minutter etter treningen. Det er først etter 30 minutter (09:50) at konsentrasjonen av AMP begynner å reguleres tilbake mot normalt.



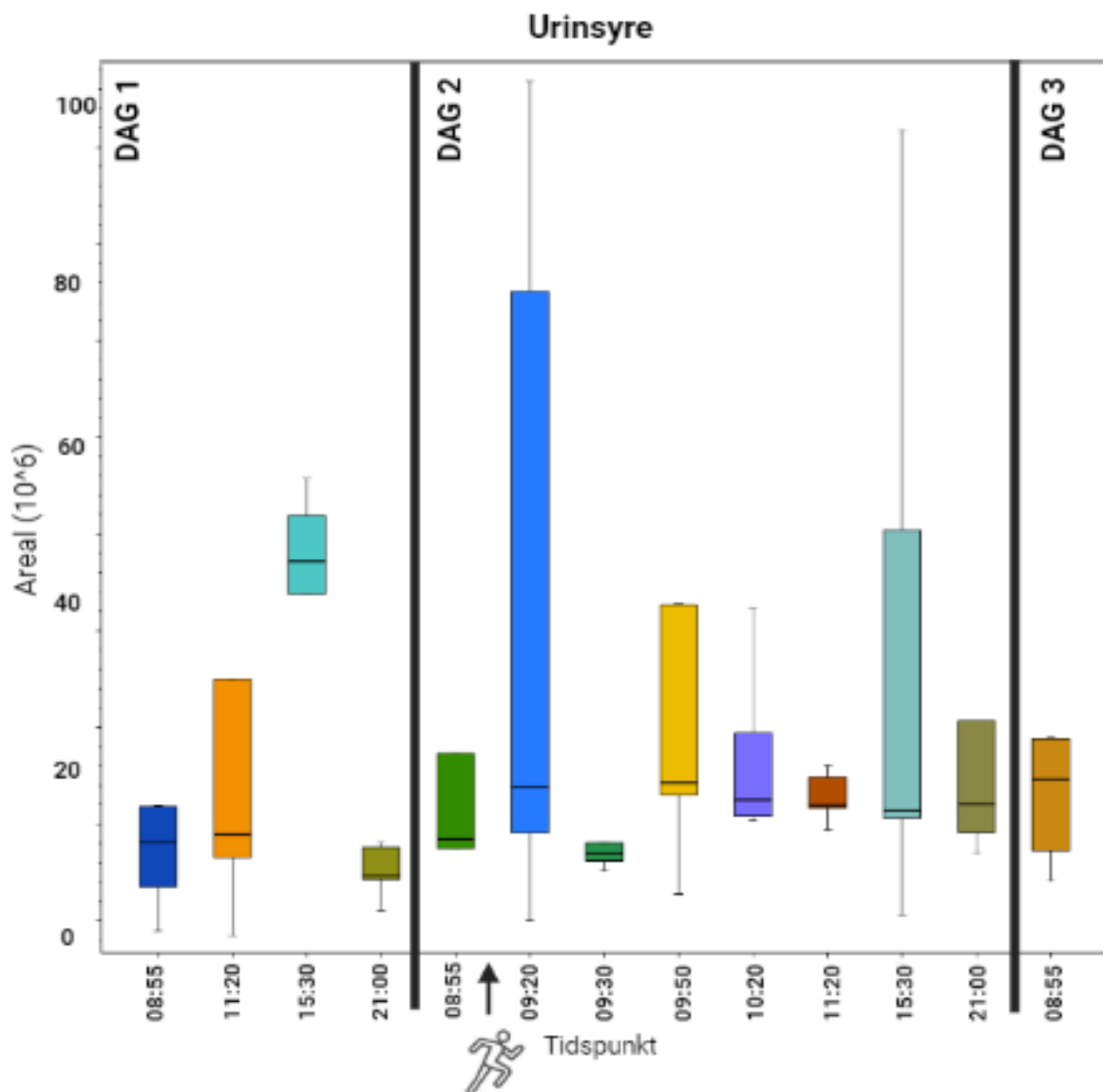
Figur 14: Adenosin monofosfat (AMP). Box whisker plott som viser målt toppareal av AMP fra fem friske frivillige tatt i tre dager til forskjellige tider i løpet av dagene. Dag 1 hadde deltakerne en kontrollert diett med en vanlig arbeidsdag. Dag 2 hadde deltakerne en høyintensiv trening (den løpende figuren) med en kontrollert diett lik som dag 1. Dag 3 ble kun den fastende prøven samlet. Resultatene som vises er i positiv ionisering og hentet fra Compound Discoverer.

Mengde hypoxantin ser ut til å være økt rett etter trening. **Figur 15** viser tydelig at hypoxantin øker kraftig ett minutt etter trening. Det er ett punkt i box-whiskeren på tidspunktet 09:20 som er veldig høy og minker til neste prøvetid. Det gjør at boksen blir svært høy på dette tidspunktet. Det er først i tidspunkt 10:20 at arealet av hypoxantin tydelig begynner å falle, og en ser en klar trend.



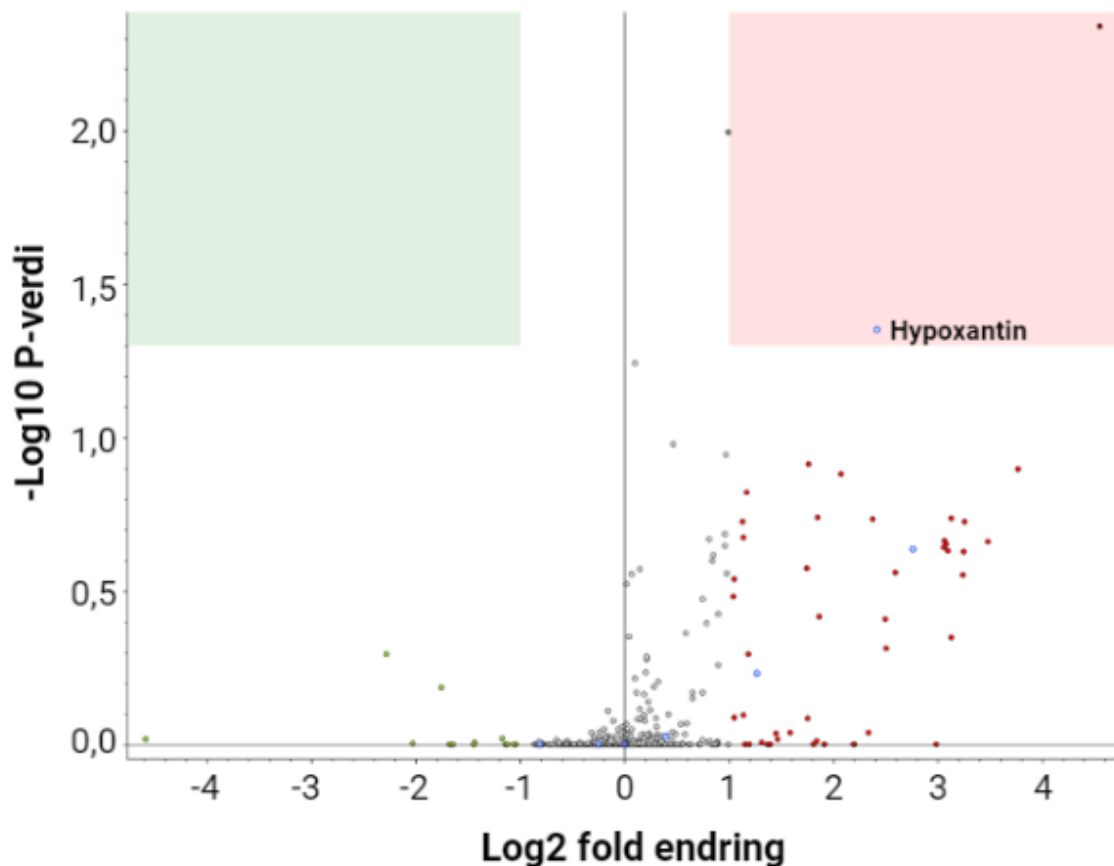
Figur 15: Hypoxantin. Box whisker plott som viser målt toppareal av hypoxantin fra fem friske frivillige tatt i tre dager til forskjellige tider i løpet av dagene. Dag 1 hadde deltakerne en kontrollert diett med en vanlig arbeidsdag. Dag 2 hadde deltakerne en høy intensiv trening (den løpende figuren) med en kontrollert diett lik som dag 1. Dag 3 ble kun den fastende prøven samlet. Resultatene som vises, er i positiv ionisering og hentet fra Compound Discoverer.

Sluttproduktet til adenin-nukleotid katabolismen, urinsyre, viser i **Figur 16** på dag 2 stor spredning hos de ulike deltakerne på de ulike prøvetakingstidspunktene. Det gjør det vanskelig å tolke om det foreligger reelle treningsinduserte forandringer eller ikke. En ser også i prøvene fra dag 1 at det er forskjeller mellom de tre prøvetakingstidspunktene som ikke er relatert til fysisk aktivitet.



Figur 16: Urinsyre. Målt areal av urinsyre i DBS-prøver fra fem friske kandidater tatt i forskjellige tidspunkter i en periode på tre dager. Dag 1 hadde deltakerne en kontrollert diett med en vanlig arbeidsdag. Dag 2 hadde deltakerne en høy intensiv trening (den løpende figuren) med en kontrollert diett lik som dag 1. Dag 3 ble kun den fastende prøven samlet. Resultatene som vises, er i positiv ionisering og hentet fra Compound Discoverer.

Vulkanplottet i **Figur 17** sammenligner metabolomet fra dag 2 rett før trening (08:55) med metabolomet 30 minutter etter trening (09:50). Plottet viser at mengde hypoxantin har signifikant økt etter trening. Vulkanplottet stemmer overens med observasjonene for hypoxantin vist i **Figur 15**, der mengden av hypoxantin økes frem til 30 minutter etter trening (09:50).



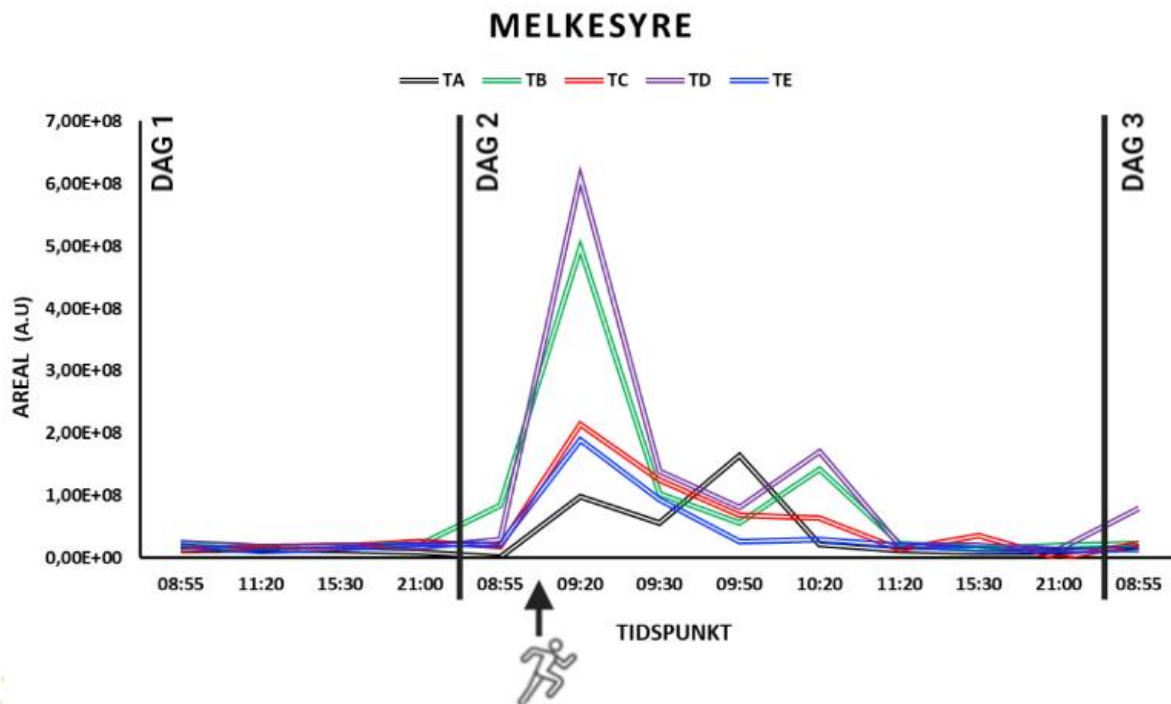
Figur 17: Vulkanplott av metabolomet rett før trening (08:55) sammenlignet med metabolomet 30 minutter etter trening (09:50) for analytter detektert med positiv ionisasjon. Metabolitter liggende innenfor de fargede områdene er statistisk signifikant for den gitte P-verdien og fold endringen. Det grønne området viser mengde metabolitter det er mindre av, og det røde området viser mengde metabolitter det er mer av. P-verdi-grensen er satt til å være $<0,05$. Resultat er hentet fra Compound Discoverer.

4.2.2 Melkesyre påvirket av trening

Melkesyre, også kalt for laktat, er kjent for å produseres i høye mengder i cellene når det er mangel på oksygen, noe som er tilfelle under intensiv trening. Laktatkonsentrasjonen i blodet er mye brukt som biomarkør for intensiv trening. Den metabolske veien glukoneogenese involverer dannelsen av glukose fra laktat og aminosyrer. Pyruvat reduseres til laktat under anaerobe forhold for å gjendanne nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) som trengs for å fortsette glykolysen [45].

Laktat ble funnet å være i større mengder i prøver tatt rett etter trening, som vist i grafen på **Figur 18**. En kan observere dette i grafen i tidspunkt 09:20, som er ett minutt etter trening,

der alle prøvene viser en økning i mengde i dette punktet. Selv om ikke alle prøver øker med den samme mengden med laktat, så kan en fortsatt se en økning fra alle de fastende prøvene som ble tatt 08:55 sammenlignet med prøvene som ble tatt rett etter trening, 09:20.



Figur 18: Målt toppareal av melkesyre i prøver fra fem friske frivillige, tatt i tre dager til forskjellige tidspunkter i løpet av dagene i negativ ionisering. Resultatene er hentet fra FreeStyle og overført i Excel.

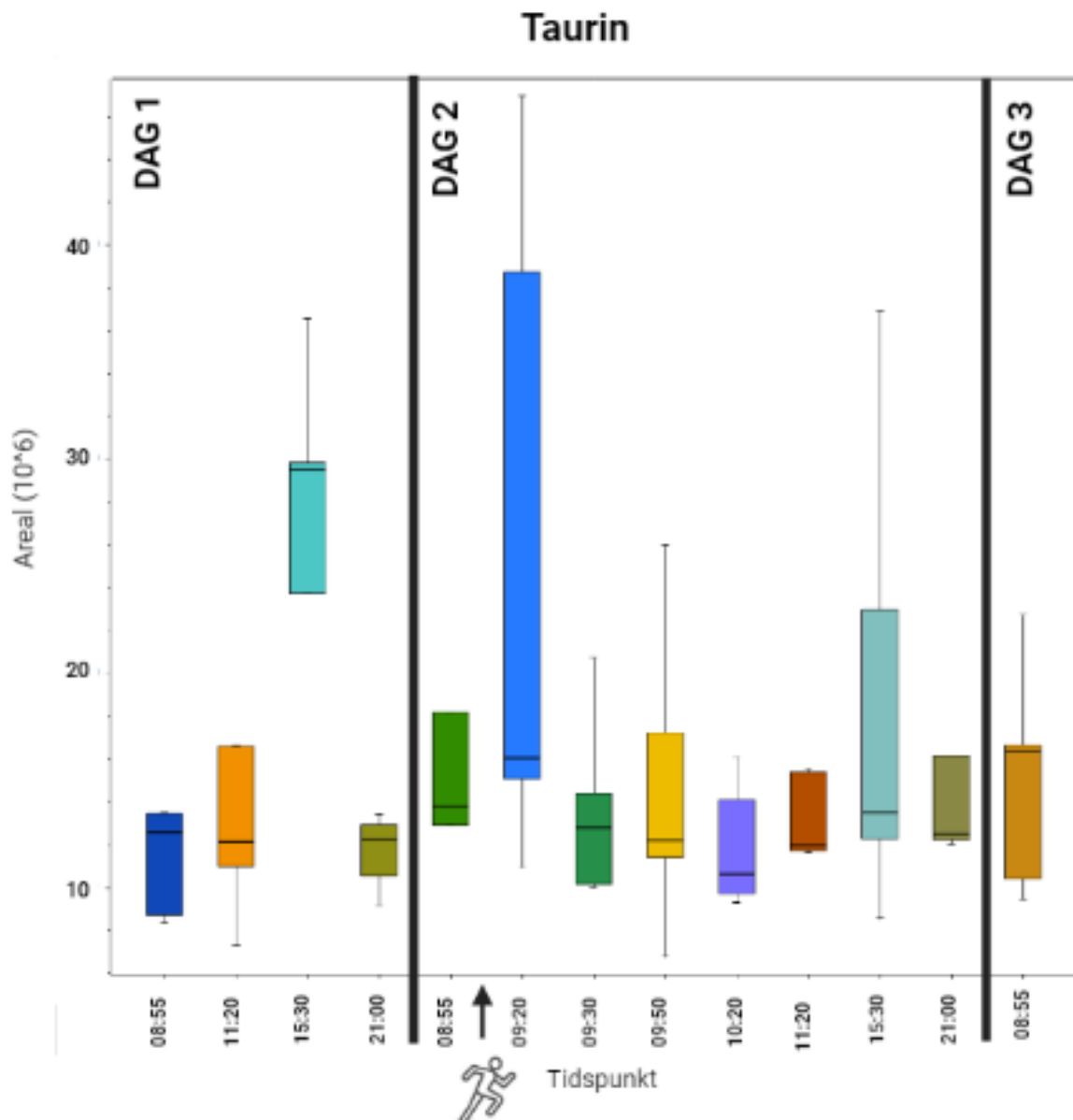
I tidsperioden mellom ti minutter (09:30) og en halvtime (09:50) etter treningen kan en se at det er mindre mengde av laktat hos nesten alle prøvene utenom TA. Her kan en observere at laktat hos forsøksperson TA holder seg lavt i ti minutter etter trening, men øker igjen i mengde 30 minutter etter trening.

Prøvene som er tatt én time etter trening viser at to av deltakerne fortsatt har forhøyede nivåer av laktat, mens det for de tre andre nå er lavere eller normaliserte nivåer.

Den kraftige økningen av laktat i prøvene som ble tatt rett etter trening stemmer med de biologiske prosessene som kroppen gjennomgår under anaerobe forhold.

4.2.3 Taurin påvirket av trening

Taurin er en ikke-essensiell aminosyre for voksne og en essensiell aminosyre for nyfødte. Hos voksne kan en lage taurin selv samtidig som man kan få høyt innhold av det fra kjøtt og fisk. Taurin blir dannet gjennom den metabolske veien fra metionin og cystein. Mange får i seg taurin gjennom energidrikker, og det er kjent for å ha en effekt på mental og fysisk prestasjon [43].



Figur 19: Målt toppareal av taurin i prøver fra fem friske frivillige, tatt i tre dager til forskjellige tidspunkter i løpet av dagene målt med positiv ionisering. Resultat er hentet fra Compound Discoverer.

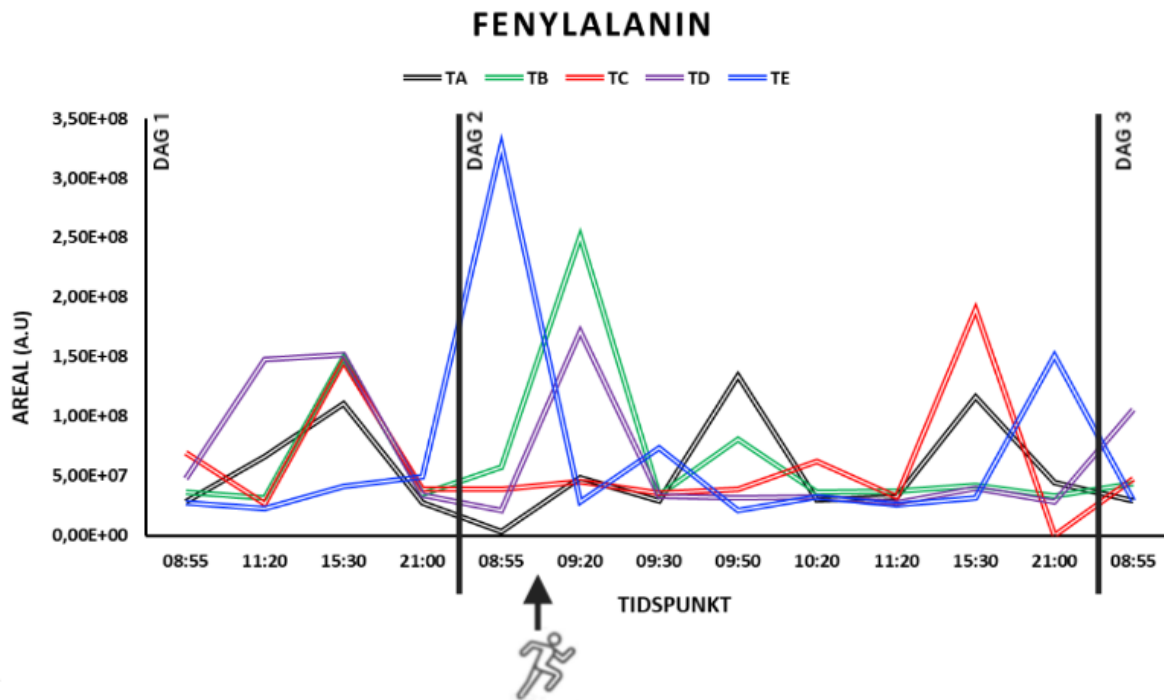
Det blir vist i **Figur 19** en økning av arealet til taurin rett etter trening. Hos noen deltakere har det hatt en mer økende effekt enn hos andre. Økningen er kortvarig og ser ut til å være tilbake til normalt etter ti minutter. Deretter holder taurinnivået seg jevnt helt til rett før middag, der det hos noen har fått en økning igjen. Dette kan skyldes at lunsjen har hatt en innvirkning med tanke på at taurin også kan være en essensiell aminosyre. Også i dag 1 var det en tydelig økning av taurin på samme tidspunkt.

4.2.4 Fenylalanin påvirket av trening

Fenylalanin er en essensiell aminosyre, som vil si at kroppen ikke kan syntetisere sin egen fenylalanin, men må i stedet få i seg dette fra mat. Dynamisk trening vil stimulere aminosyreoksidasjonen i forhold til intensiteten av treningen [46].

Aminosyrekonsentrasjonen i plasma er funnet å være høyere hos trente individer enn hos utrente [47].

Ved å se på **Figur 20**, kan en se at i dag 1 så øker mengde med fenylalanin i prøven som er tatt rett før middag, altså etter at de fem frivillige har fått i seg den samme dietten i lunsjen. Det samme gjelder også for dag 2 der fenylalanin også øker i prøven tatt på samme tidspunkt (15:30). Videre kan en observere at fenylalanin gir et høyere utslag i noen av prøvene som er tatt ett minutt etter den intense treningsøkten.



Figur 20: Målt toppareal av fenylalanin i prøver fra fem friske frivillige, tatt i tre dager til forskjellige tidspunkter i løpet av dagene. Prøvene er kjørt i positiv ionisering. Resultatene er hentet fra FreeStyle-programmet og overført i Excel.

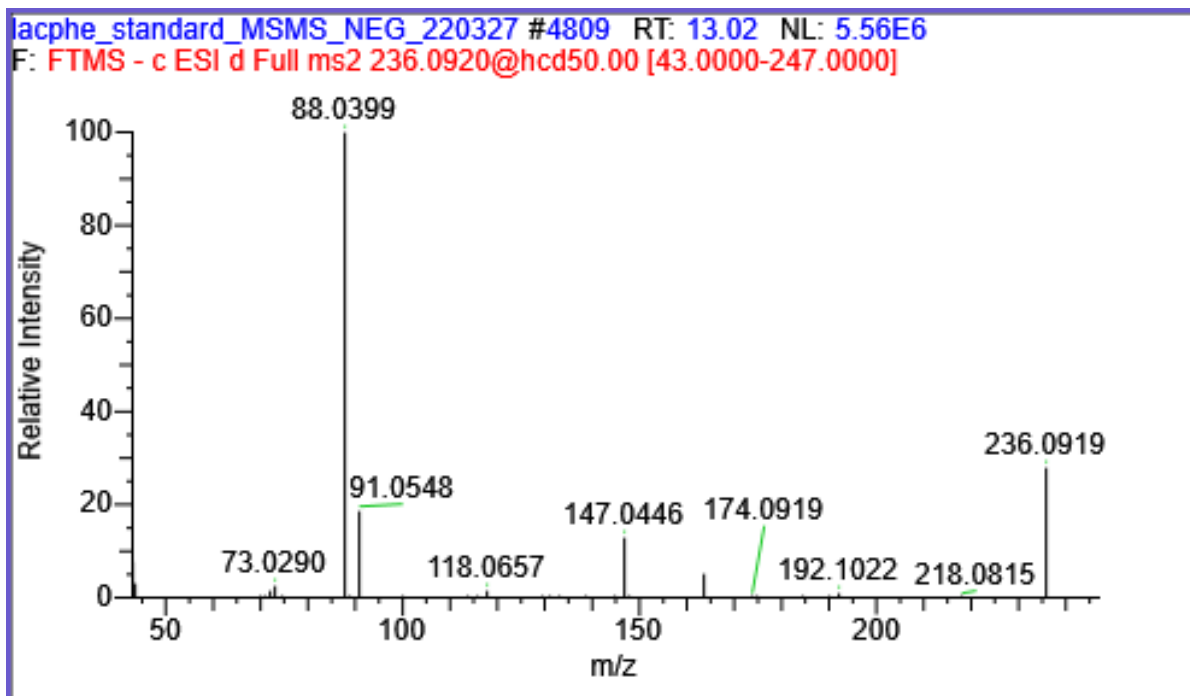
Dersom en ser nærmere på **Figur 20**, så kan det observeres at det er noe spesielt med den blå grafen som tilhører TE. Denne gir ofte et utslag enten tidligere eller senere enn alle de andre prøvene. Dette vises tydelig i prøven til TE som er tatt fastende før trening (08:55) dag 2, fordi her kan en se et ganske høyt utslag av fenylalanin sammenlignet med alle de andre personene. Det viktigste å bemerke seg med TE er at mengde fenylalanin minker rett etter trening (09:20) i forhold til alle de andre prøvene, som øker.

4.2.5 Lac-Phe som biomarkør

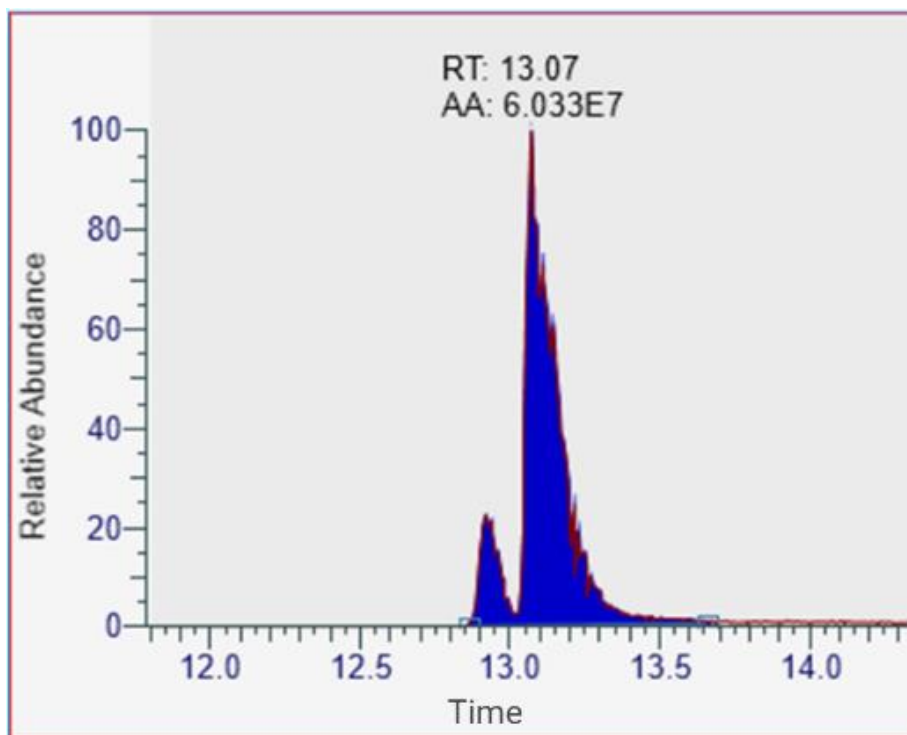
N-laktoyl-fenylalanin (Lac-Phe) er en metabolitt som produseres ved intens trening. Lac-Phe er et konjugat av laktat og fenylalanin. Denne metabolitten ble valgt å se nærmere på ettersom det har blitt utført tidligere forsøk om å finne Lac-Phe i blodprøver etter en treningsøkt [40]. Lac-Phe er lite studert og har en funksjon som er dårlig kartlagt. Det er derfor en interessant metabolitt å studere i dette forsøket.

For å finne retensjonstiden til Lac-Phe, ble en Lac-Phe standard analysert. Den ble både kjørt i fullscan-MS og MSMS for å få fragmenteringsspekteret.

Figur 21 viser fragmenteringsspekteret til Lac-Phe i negativ ionisasjon. Lac-Phe har en molekylmasse på 237,25 g/mol, og med deprotonering av syregruppen er m/z -verdien 236,092. Det ble funnet ut at retensjonstiden til Lac-Phe er 13,07 minutter, som vist i **Figur 22**, som gjør det mulig å lete etter metabolitten på FreeStyle-programmet hos biologiske prøver.



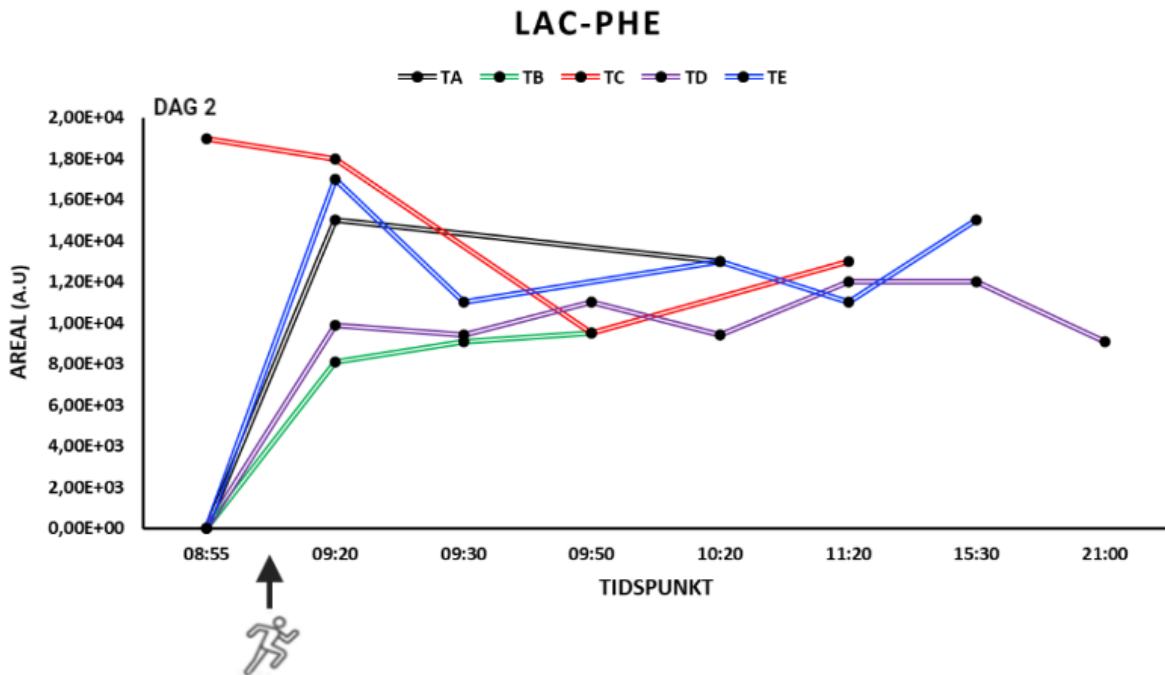
Figur 21: Fragmenteringsspekter av N-laktoyl-fenylalanin i negativ ionisasjon. m/z -verdien til Lac-Phe er 236,092 kjørt som $[M-H]^-$, og et fragment på 88,040. Retensjonstiden til Lac-Phe ble funnet å være 13,02 minutter.



Figur 22: Det totale ione kromatogrammet (TIC) for N-laktoyl-fenylalanin standard som viser retensjonstid og toppareal. Resultatet er hentet FreeStyle, og er fra negativ ionisering.

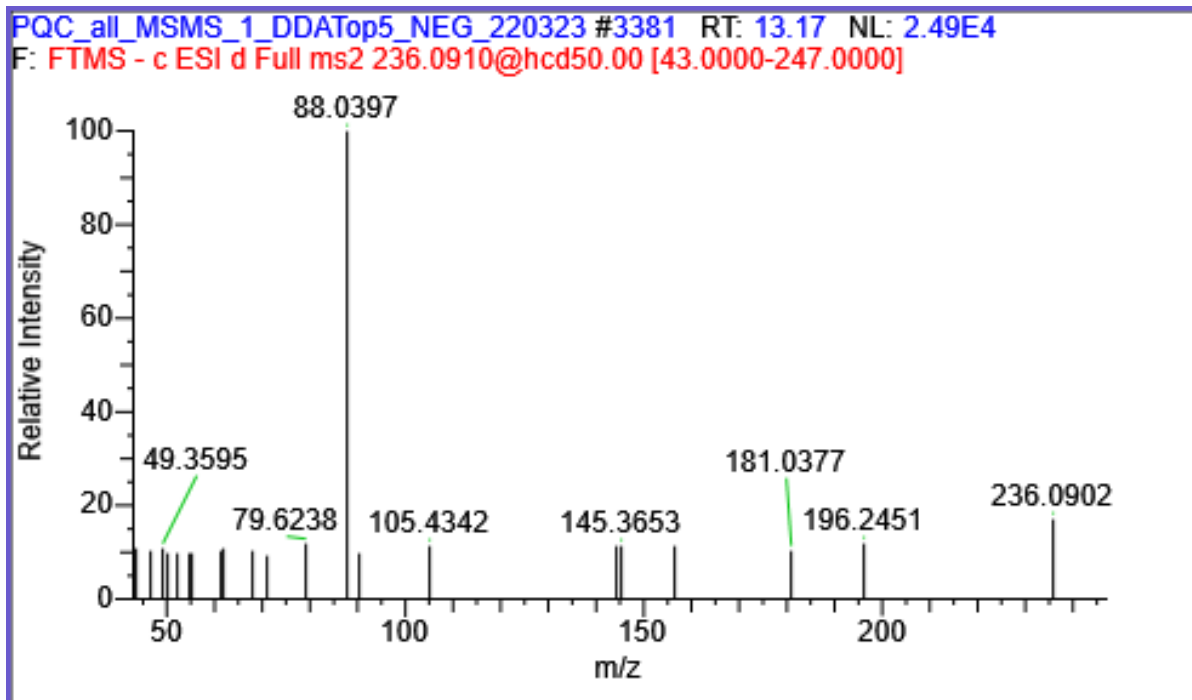
Det er vist i **Figur 23** en graf av Lac-Phe arealene til de fem forsøkspersonene for bare dag to prøvene. Siden det ikke ble funnet Lac-Phe i alle prøvene, men kun i noen, kan en observere at linjene stopper på forskjellige tidspunkter i grafen. I den fastende prøven (08:55) er verdiene satt til å være null for nesten alle forsøkspersonene, grunnet at Lac-Phe ikke ga noe utslag, med unntak av forsøksperson TC der Lac-Phe ble detektert i den fastende prøven. Dermed kan en observere en økning i prøven tatt rett etter trening (09:20) hos nesten alle forsøkspersonene utenom TC som viser en reduksjon, fordi den allerede har et høyt utslag av Lac-Phe i den fastende prøven (08:55).

Retensjonstidene til arealene er i samsvar med retensjonstiden som ble funnet for Lac-Phe-standarden. Arealene fra figuren ligger mellom 10^3 og 10^4 , noe som tyder på at mengden Lac-Phe i prøvene er ganske lave, og en ønsker som tidligere nevnt verdier over 10^4 .



Figur 23: Målte arealer av Lac-Phe i prøver fra fem friske frivillige, fra bare dag 2. Prøvene er kjørt i positiv ionisering. Resultatene er hentet fra FreeStyle-programmet og overført i Excel.

For å bekrefte at utslagene fra **Figur 23** er Lac-Phe, ble det sett etter fragmenteringsspekteret med samme fragmenter fra PQC-prøver. Fragmenteringsspekteret ble funnet i negativ ionisering i en analyse bestående av dag to og tre prøvene, som vist i **Figur 24**.



Figur 24: Fragmenteringsspekter av Lac-Phe i PQC-prøven til analysen bestående av dag to og tre prøver i negativ ionisasjon. m/z -verdien til Lac-Phe er 236,092 etter tap av et proton, og det vises et tydelig fragment på 88,040.

Fragmenteringsspekteret til Lac-Phe i PQC-prøven fra analysen som inneholdt kun prøver fra dag to og tre, **Figur 24**, viser signaler med en retensjonstid ved 13,17 minutter. Signalene som ga utslag, har m/z -verdiene 88,040 og 236,090 lik som fragmenteringsspekteret fra **Figur 21**. Dette er med på å forsterke teorien om at arealene i **Figur 23** tilhører Lac-Phe. Siden det er blitt bekreftet med standard, gir det et konfidensnivå 1.

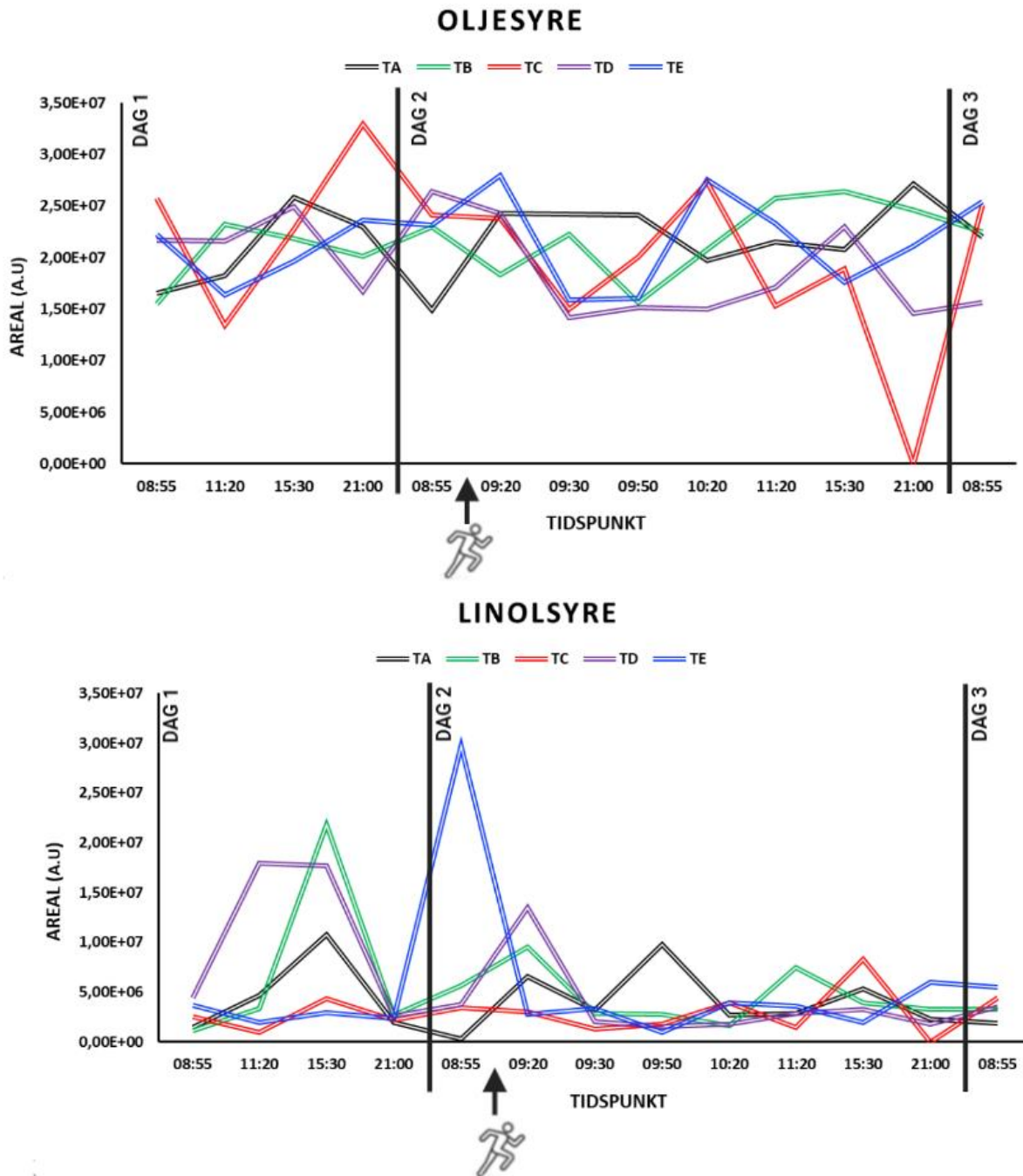
4.3 Metabolitter hvor det ikke er observert endring i nivåer som følge av trening

Siden det overordnede målet med dette prosjektet var å påvise biomarkører ved å se på metabolitter som har en endring i nivåer som følge av trening, ble det fokusert på metabolitter fra forskjellige metabolske veier. I tillegg til de metabolittene som allerede er beskrevet i de foregående kapitlene, er det da snakk om fettsyrer (oljesyre og linolsyre), metabolitter knyttet til sitronsyresyklusen (suksinat og fumarat) og neurotransmittere (acetylkolin og kolin).

4.3.1 Fettsyrene, oljesyre og linolsyre

Forekomsten av de to fettsyrene, oljesyre og linolsyre (se **Tabell 2**) i alle prøvene, er vist i **Figur 25**. Under trening er fett et svært viktig substrat for muskelsammentrekningen.

Triglyserider er kjent for å være hovedkilden til de frie fettsyrene som oksideres til acetyl-CoA under trening [48]. Gjennom denne oksidasjonen så vil elektroner bli fjernet og passere gjennom luftveiskjeden, som vil bidra med å fremme ATP-syntesen. Grunnet dette forventes det å finne en umiddelbar økning i fettsyrer i blodprøvene som er tatt rett etter trening [49].



Figur 25: Oljesyre (øverst) og linolsyre (nederst). Målt toppareal av oljesyre og linolsyre fra fem friske frivillige, tatt i tre dager i forskjellige tidspunkter i løpet av dagene. Resultatene som vises er fra positiv ionisering, og hentet fra FreeStyle og overført i Excel.

Fettsyrene, som vist i **Figur 25**, viser ingen statistisk signifikant økning i prøvene som ble tatt rett etter trening. En kan se hos linolsyre at grafene til TA, TB og TD viser en økning i prøven som er tatt ett minutt etter trening (09:20), mens det i TC og TE viser en reduksjon.

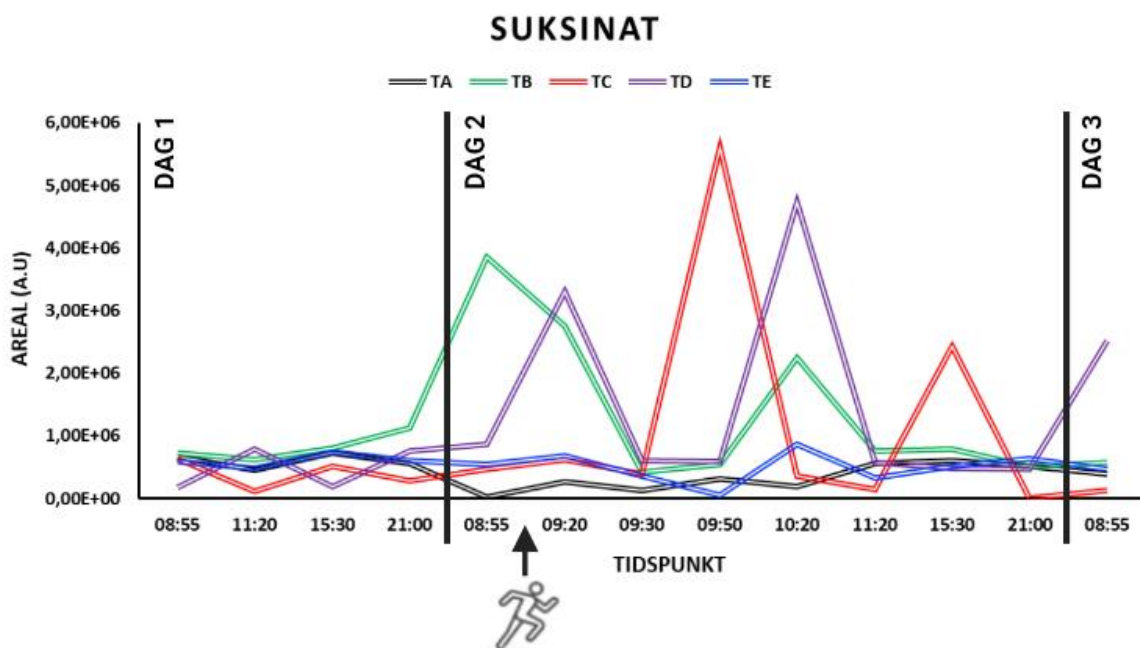
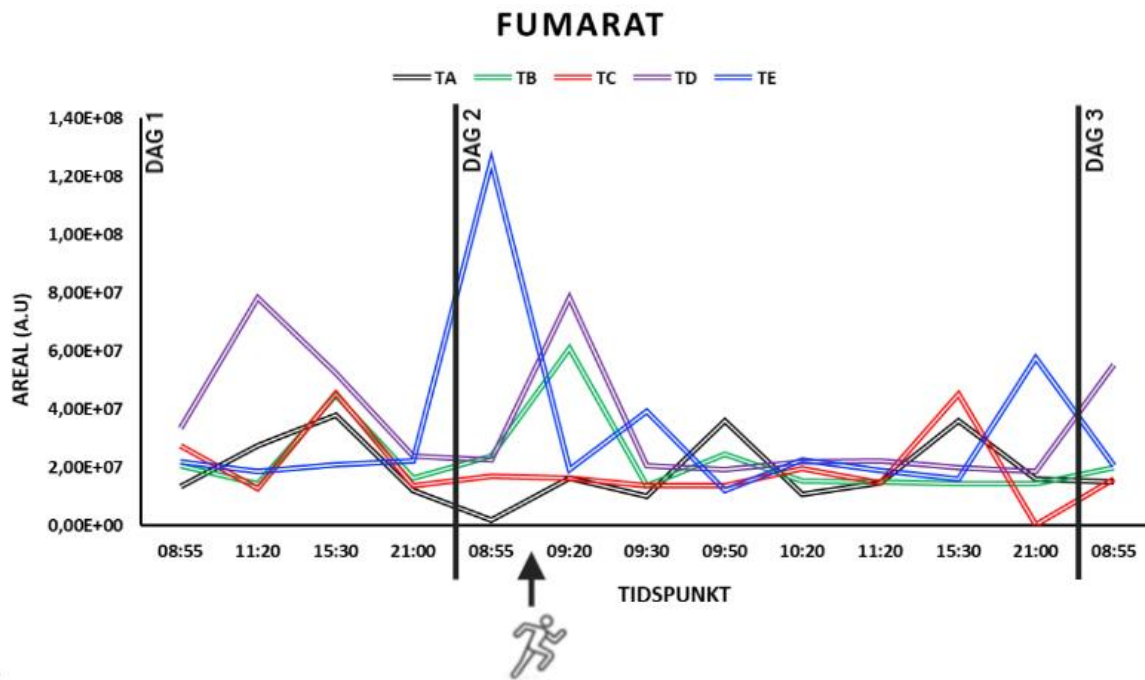
Hos oljesyre kan en se at noen av grafene viser økninger i mengde, mens andre viser en nedgang i mengde i prøvene rett etter trening.

Ut ifra resultatene som er vist, er ingen endring i fettsyrenivåene påvist som følge av trening.

4.3.2 Metabolitter i sitronsyresyklusen, fumarat og suksinat

Fumarat og suksinat er metabolitter som inngår i trikarboksylsyresyklusen (TCA-syklusen), som er en fundamental metabolsk prosess som foregår i mitokondriene i cellene. Under anaerobe forhold øker oksygenforbruket og energiforbruket i kroppen, som fører til en økning i TCA-syklusen og produksjon av flere metabolitter, inkludert fumarat og suksinat [50].

Ved å se på **Figur 26** kan en observere at det ikke er noen tydelige trender for verken fumarat eller suksinat.



Figur 26: Fumarat (øverst) og suksinat (nederst). Målt toppareal av fumarat og suksinat fra fem friske frivillige, tatt i tre dager i forskjellige tidspunkter i løpet av dagene. Resultatene som vises av fumarat er tatt fra positiv ionisering og resultatene av suksinat er tatt fra negativ ionisering, og hentet fra FreeStyle og overført i Excel.

Grafen for fumarat, tatt fra positiv ionisering, viser igjen at det er noe mystisk med TE-prøven da den gir et høyt utslag av fumarat i den fastende prøven (08:55) på dag 2. I motsetning til alle de andre deltakerne, så har TE en tydelig reduisering i nivå i prøven som

ble tatt ett minutt etter trening (09:20). Hele dag 1 og resten av dag 2 og 3, utenom prøven som ble tatt ett minutt etter trening, viser ikke en god nok trend til å kunne knytte det opp mot endringer som skyldes trening.

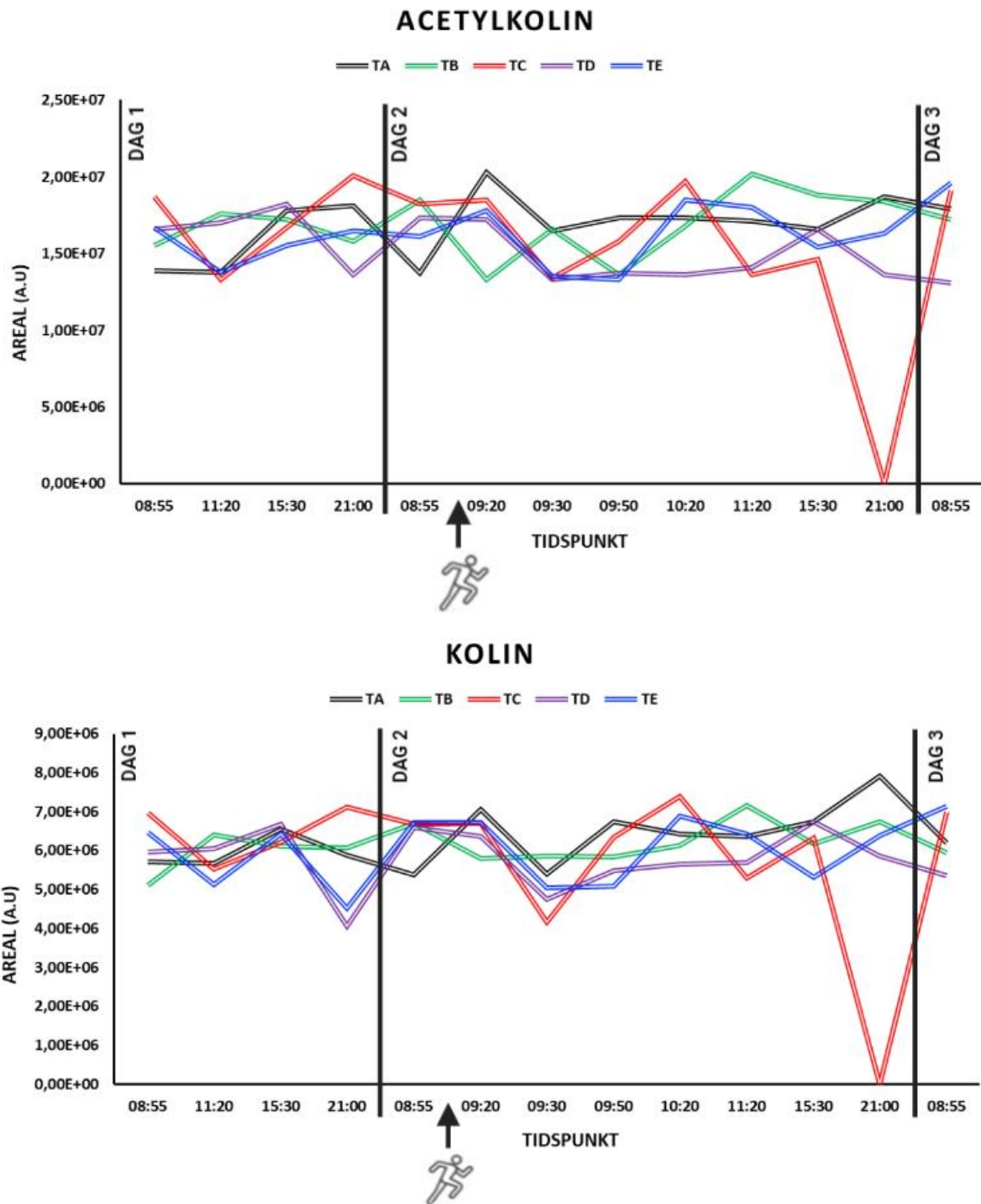
Hos suksinat kan en se at det er variasjoner blant deltakerne i dag 1, som fører til at ingen trender kan observeres. I den fastende prøven på andre forsøksdag så er det plutselig en økning i suksinatnivået for deltaker TB, men i prøven som ble tatt ett minutt etter trening er det en nedgang i nivået. Videre i dag 2 kan en observere en åpenbar variasjon blant deltakerne.

Observasjoner av fumarat og suksinat viser dermed ikke et godt nok mønster med grunnlag for forventninger om at disse metabolittene skal vise en økning i nivå etter trening.

4.3.3 Nevrotransmittere, acetylkolin og kolin

Acetylkolin er en nevrotransmitter som spiller en viktig rolle i overføringen av signaler mellom nerveceller og muskelceller, og er avhengig av kolin for å bli syntetisert. Kolin er et essensielt næringsstoff som finnes i mat og er nødvendig for normal kroppsfunksjon.

Under høyintensitet trening øker aktiviteten i nervesystemet og muskelcellene, som fører til en økning i frigjøringen av acetylkolin, som vil bidra til stimulering av muskelkontraksjonen og bedre fokus under og etter treningen [42].



Figur 27: Acetylkolin (øverst) og kolin (nederst). Målt toppareal av acetylkolin og kolin fra fem friske frivillige, tatt i tre dager i forskjellige tidspunkter i løpet av dagene. Resultatene som vises er tatt fra positiv ionisering, og hentet fra FreeStyle og overført i Excel.

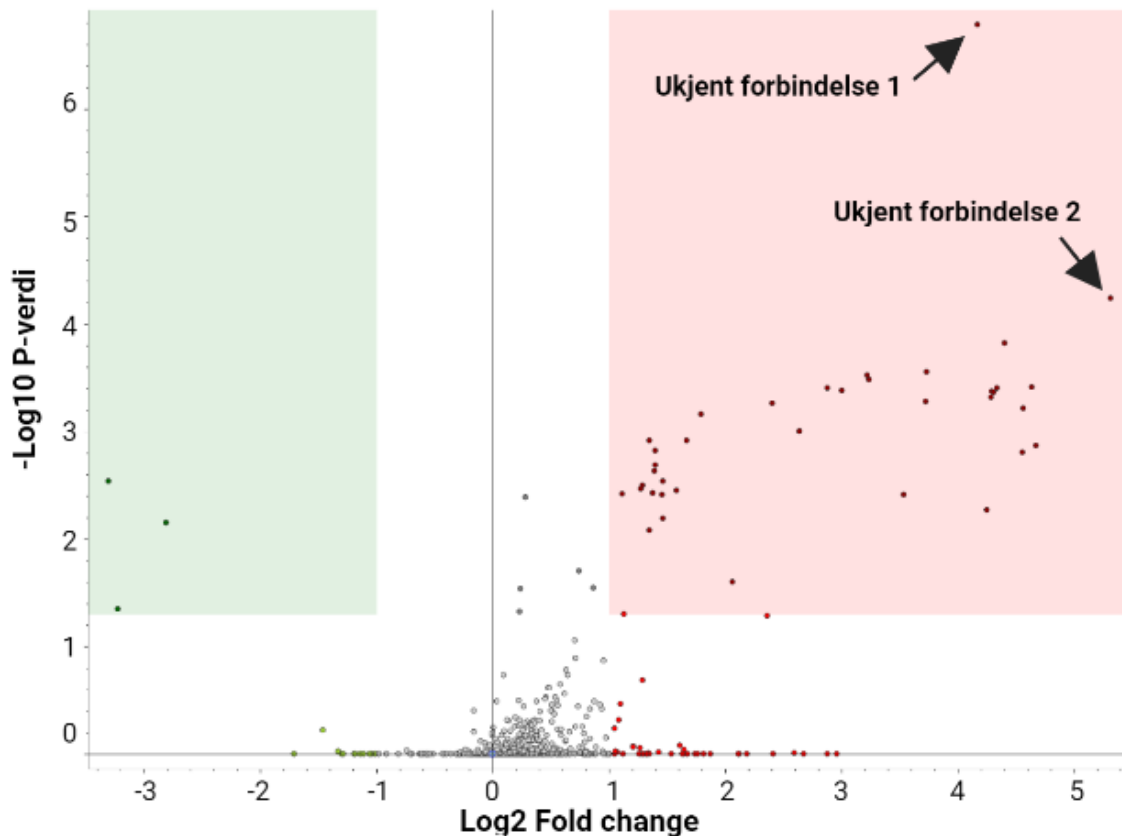
For både acetylkolin og kolin, kan en observere at det er en blanding av resultatene blant prøvene som er tatt rett etter trening ettersom det er noen som viser en økning i nivå mens andre viser en reduksjon. Spesielt acetylkolin viser mange variasjoner i alle tidspunktene, og

en kan ikke se et tidspunkt der alle prøvene har en felles økning eller reduksjon, ettersom det alltid er én eller to som skiller seg ut fra resten av grafene.

Hos kolin så viser tre av de fem grafene en reduksjon i prøven som ble tatt ett minutt etter trening (09:20), når det i utgangspunkt ble forventet en økning. På lik linje som acetylkolin, viser også kolin ganske store variasjoner mellom prøvene slik at en tydelig trend ikke kan observeres.

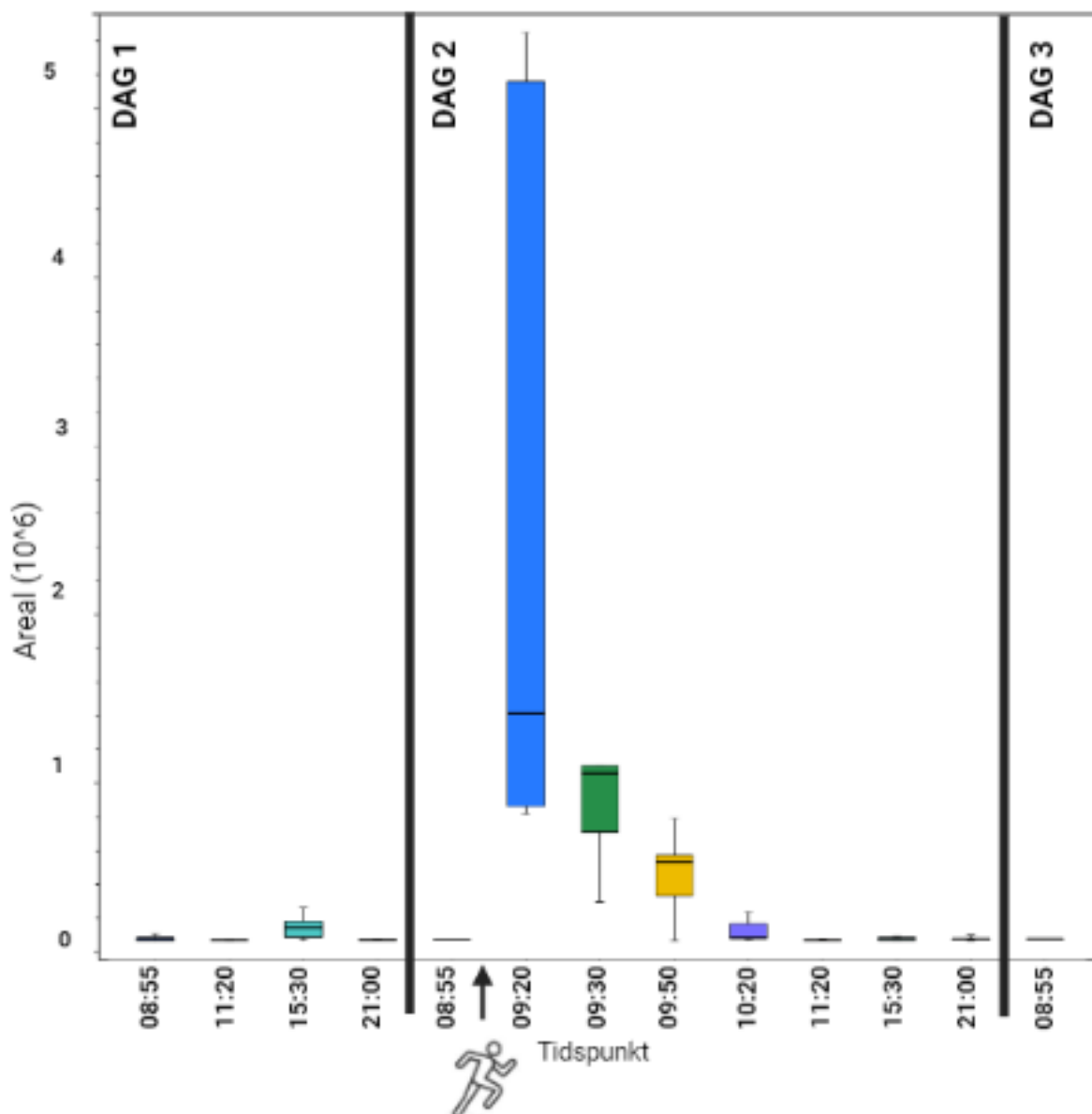
4.4 Mulig biomarkør av ukjent identitet

Ved å se på et vulkanplott utført av en global metode, forventes det å finne metabolske endringer eller biomarkører knyttet til treningen. Ved å sammenligne prøven som er 10 minutter etter trening (09:30) med prøven som er rett før trening (08:55), ble *to* ukjente forbindelser oppdaget. Disse *to* forbindelsene er signifikant og kraftig økt i mengde i prøven tatt 10 minutter etter trening, slik som det fremgår av vulkanplottet i **Figur 28**.



Figur 28: Vulkanplott av ukjente metabolitter/biomarkører med lav $-\text{Log}_{10}$ P-verdi og høy Log_2 Fold change. Ukjent forbindelse 1 hadde m/z - verdi 157,02472. Ukjent forbindelse 2 hadde m/z -verdi 295,06020. En sammenligning av prøver tatt rett før trening (08:55) og rett etter trening (09:20). Resultat er hentet fra Compound Discoverer.

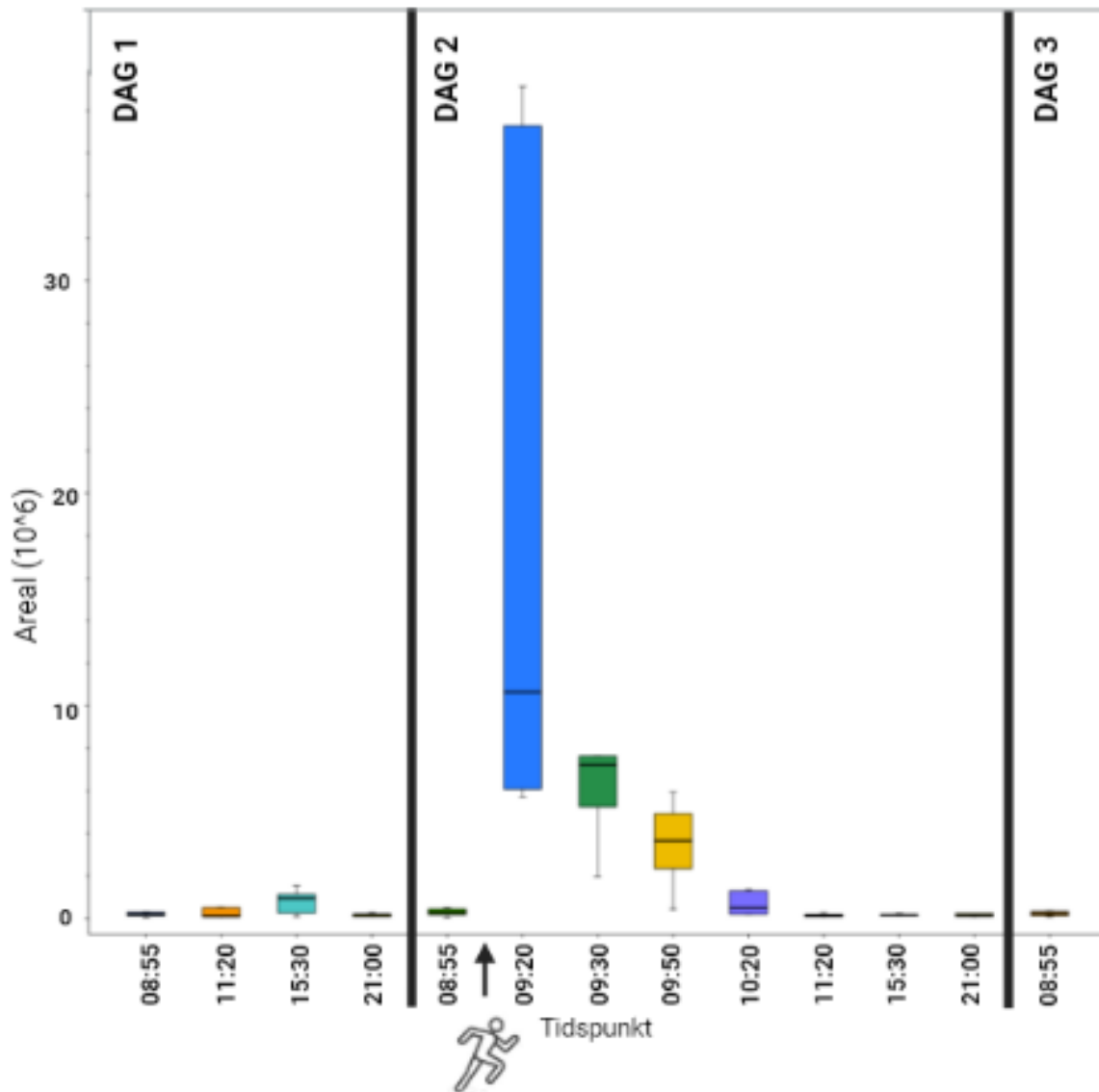
Box-whiskeren for «ukjent forbindelse 1» i **Figur 29**, viser en enorm økning i mengde etter trening (09:20) som gradvis reguleres ned i løpet av en time. Det interessante med box-whisker resultatet er at i de andre tidspunktene i dag 1 og resten av dag 2 ligger arealet nesten på null. Informasjonen som var tilgjengelig for denne ukjente forbindelsen, var en m/z -verdi på 157,025 og molekylvekt på 312,035 g/mol. I tillegg lå retensjonstiden på 3,129 minutter. Retensjonstiden er relativt kort, som forteller en at stoffet er polart. På grunn av mangel på molekylformel og fragmenteringsspekter, gir dette et konfidensnivå på 5.



Figur 29: Box-whisker av ukjent forbindelse 1 med m/z -verdi på 157,02472. En kraftig økning umiddelbart etter trening og en påfølgende reduksjon tilbake til normalverdier etter trening. Arealet ligger veldig lavt i tidspunktene i dag 1 og resten av dag 2. Resultat er hentet fra Compound Discoverer.

Figur 30 viser box-whiskeren for «ukjent forbindelse 2». Den illustrerer en ganske så lik trend som ukjent forbindelse 1, en enorm økning i mengde etter trening (09:20) som gradvis reguleres ned i løpet av en time. Her ligger arealene også nesten på null for tidspunktene i dag 1 og resten av dag 2. Informasjonen som var tilgjengelig for ukjent forbindelse 2, var en m/z -verdi på 295,060 og molekylvekt på 294,053 g/mol. I tillegg lå retensjonstiden på 3,127 minutter. Retensjonstiden er relativt kort, som forteller en at stoffet er polart. På grunn av

mangel på molekylformel og fragmenteringsspekter, gir dette et konfidensnivå på 5 med tanke på identifikasjon.



Figur 30: Box-whisker av ukjent forbindelse 2 med m/z -verdi på 295,06020. En kraftig oppregulering rett etter trening og en sakte nedregulering etter trening, mens arealet ligger veldig lavt i tidspunktene i dag 1 og resten av dag 2. Resultat er hentet fra Compound Discoverer.

Av den informasjonen som ble funnet om de to ukjente forbindelsene, viste det seg at retensjonstiden til begge er like. Når to forbindelser elueres med samme retensjonstid, tyder det på samme forbindelse. Siden disse hadde forskjellige molekylvekt og m/z -verdier, blir disse to da «features» av én opprinnelig forbindelse. En «feature» er en karakteristikk av et

molekyl. Grunnen til at det vises som to punkter i vulkanplottet i **Figur 28**, er fordi denne forbindelsen er blitt separert som to «features» i ionekilden.

For å konkludere, så er «ukjent forbindelse 1» og «ukjent forbindelse 2» egentlig to «features» av én og samme metabolitt. Dette er da mest sannsynlig samme stoff, fordi de har samme retensjonstid og samme kurveforløp.

5. Oppsummering og diskusjon

Stor spredning i PQC-prøvene

Resultatene fra den første analysen viste et PCA-plott som ikke møtte kvalitetskravene. PQC-prøver inneholder i utgangspunkt en del fra hver biologisk prøve, og derfor var det uvanlig at det var så stor spredning mellom PQC-prøvene. Det ble avdekket at den observerte spredningen av PQC-prøvene skyldtes en feil i sekvensen (se **Vedlegg C i Tabell C.1**) som ble laget for den første analysen. Der var det glemt å sette inn PQC-injeksjoner i starten av analysen, før de andre biologiske prøvene ble injisert. Dermed ble det besluttet å starte prøveopparbeidelsen på nytt og rette opp i feilen i sekvensen. Etter at denne prosessen var gjennomført, ble det utført en ny analyse, som resulterte i et nytt PCA-plott. I det nye plottet kunne en observere at PQC-prøvene var samlet sammen i sentrum, noe som indikerer en høy grad av kvalitet og ga logiske resultater.

PQC-prøver er en viktig kvalitetskontroll for analyseringen av biologiske prøver, og sammen med SST-prøver gir de informasjon om nøyaktigheten og påliteligheten til resultatene. Derfor er det avgjørende å identifisere og korrigere eventuelle feil eller unøyaktigheter som påvirker kvaliteten på resultatene. Dette inkluderer også å undersøke mulige årsaker til spredning i et PCA-plott, som kan bidra til å optimalisere og forbedre analysen.

Avvik som involverer forsøksperson TE

Det har tidligere blitt påpekt et avvik i forsøket som involverer forsøkspersonen TE i mange av resultatene. En høy økning i signaler fra metabolitter har blitt observert i den fastende prøven rett før trening fra andre forsøksdag, etterfulgt av at signalene synker i prøven som er tatt ett minutt etter trening. Disse metabolittene, fenylalanin, linolsyre og fumarat, er hentet fra positiv ionisering og TE skiller seg tydelig ut fra de andre forsøkspersonene (se **Figur 20, 25 og 26**). Dersom en ser tilbake på melkesyre og suksinat (se **Figur 18 og 26**), som er hentet fra negativ ionisering, kan en observere at deltaker TE ikke skiller seg fra de andre deltakerne i den første og den andre prøven som ble tatt i dag to. Fenylalanin, linolsyre og fumarat skal i utgangspunktet ikke være i høyere nivåer før trening enn rett etter trening.

Dette gir grunnlag for teorien om at det kan være noe galt med positiv ionisering for prøve TE.

Først ble det undersøkt om den fastende prøven før trening var byttet om med prøven som ble tatt ett minutt etter trening, begge fra samme dag. Dette ble gjort ved å sjekke om plasseringen til prøvene for positiv ionisering var i samsvar med negativ ionisering i sekvensen som ble laget. Plasseringen var helt like i begge sekvensene for ioniseringsmodusene, og det var heller ingen mulighet for å endre på sekvensen underveis i kjøringen, ettersom negativ ionisering ble satt i gang automatisk rett etter positiv. Dermed ble muligheten for at feil i sekvensen kunne ha oppstått avvist.

Det ble også undersøkt om forsøksperson TE hadde fått i seg noe annet enn det som var oppgitt i matplanen, som kunne ha ført til en høy økning i nivå av de nevnte metabolittene i den faste prøven fra dag to. Siden forsøkspersonen TE ikke hadde dokumentert noe om dette, ble denne teorien forkastet.

I metabolittanalyser er det viktig at metabolitter som detekteres ved positiv og negativ ionisering, viser likhet i retensjonstid, samt at de viser sammenfallende trender. Derfor ble en forbindelse, alanin, fra SST-løsningen, som ble brukt i alle forsøk, benyttet for å se om det var noen forskjell mellom de to ioniseringsmodusene. Det ble funnet ut at i positiv ionisering minker nivået av alanin fra den fastende prøven til den prøven som ble tatt rett etter trening, mens det i negativ ionisering øker fra den fastende prøven til den prøven som ble tatt ett minutt etter trening. Dette styrker teorien om at problemet med TE muligens kan ha oppstått under positiv ionisering, men grunnet tidsbegrensninger ble det ikke testet ut andre alternativer til hvorfor TE skilte seg ut fra de fire andre forsøkspersonene.

Prøvene er ikke korrigeret for hematokrit

Prøvene i dette forsøket er ikke korrigeret for hematokrit. Hematokritnivået kan påvirke de målte metabolittmengdene på flere måter. Ettersom en prøve med høy hematokrit sprer seg mindre på DBS-kortet enn en prøve med lav hematokrit, vil det være en høyere konsentrasjon av metabolittene i en prøve med høy hematokrit sammenlignet med en prøve

med lav hematokrit [51]. For å korrigere for hematokrit er det nødvendig med nøyaktige hematokritverdier for hver prøve, og i dette tilfellet var ikke disse verdiene tilgjengelige. Dersom hematokritverdien var kjent, kunne korrigeringsfaktor ha blitt utført.

6. Konklusjon og videre arbeid

Formålet med denne oppgaven har vært å identifisere mulige biomarkører knyttet til treningsmetabolomet ved å benytte en global metabolomikk-metode. Det ble tatt utgangspunkt i en allerede etablert LC-MS/MS-metode for analyse av treningsmetabolomet, samt prøveopparbeidingen av DBS.

Flere metabolitter har blitt identifisert som potensielle biomarkører i forbindelse med trening, inkludert AMP, hypoxantin, melkesyre, taurin og fenylalanin. I tillegg har det i dette forsøket blitt undersøkt om Lac-Phe er en biomarkør knyttet til trening. I midlertidig viser resultater fra DBS-metoden at det kan være begrensninger i påvisning av Lac-Phe som en biomarkør. Dette skyldes at DBS-metoden viser for lave utslag, med toppareal som ikke overstiger 10^4 a.u. Det kan derfor være behov som videre arbeid å utarbeide alternative metoder for å gi en bedre påvisning av Lac-Phe som en biomarkør for trening.

I løpet av denne studien ble det også oppdaget en ukjent forbindelse med to «features» i den metabolske analysen. Selv om denne forbindelsen ikke har blitt identifisert, kan den likevel spille en rolle som biomarkør. Dette skyldes at metabolitter fortsatt kan fungere som biomarkører selv om deres identitet ikke er klarlagt. Så lenge metabolittenes utslag gir en signifikant økning, kan de fortsatt indikere at en person har trent, selv om identifikasjonen ikke er kjent. Det er derfor av interesse å utføre videre undersøkelser for å fortsette identifikasjonsarbeidet slik at denne forbindelsen kan bestemmes på et høyere konfidensnivå. Dette er avgjørende for å fastslå dens betydning som potensiell biomarkør for trening.

I dette forsøket ble det opprinnelig planlagt å inkludere både en treningsgruppe og en kontrollgruppe. Grunnet tidsbegrensninger var det imidlertid ikke mulig å utføre en analyse og innsamling av data for kontrollgruppen. Det hadde vært ønskelig å ha en kontrollgruppe for å kunne sammenligne de metabolske endringene i treningsgruppen med de i kontrollgruppen. Dette ville bidratt til å avdekke om de metabolske endringene i treningsgruppen er en direkte følge av treningen eller om de kan skyldes andre faktorer.

Sammenligning av resultatene fra de to gruppene ville dermed vært nyttig for å gi et mer robust og pålitelig resultat.

Litteraturliste

- [1] A. Conesa og S. Beck, «Making multi-omics data accessible to researchers», *Sci. Data*, bd. 6, nr. 1, Art. nr. 1, okt. 2019, doi: 10.1038/s41597-019-0258-4.
- [2] «Omics | Description, Fields, & Applications | Britannica», 9. desember 2022.
<https://www.britannica.com/science/omics> (åpnet 3. mai 2023).
- [3] B. Karahalil, «Overview of Systems Biology and Omics Technologies», s. 11, sep. 2016, doi: 10.2174/0929867323666160926 150617.
- [4] U. Roessner og J. Bowne, «What is metabolomics all about?», *BioTechniques*, bd. 46, nr. 5, s. 363–365, apr. 2009, doi: 10.2144/000113133.
- [5] Y. Cong og T. Endo, «Multi-Omics and Artificial Intelligence-Guided Drug Repositioning: Prospects, Challenges, and Lessons Learned from COVID-19», 6. juli 2022.
<https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/omi.2022.0068> (åpnet 3. mai 2023).
- [6] H. Rootwelt og K. B. P. Elgstøen, «Metabolomikk – ny biokjemisk gullalder for persontilpasset medisin», *Tidsskr. Den Nor. Legeforening*, apr. 2022, doi: 10.4045/tidsskr.22.0034.
- [7] W. B. Dunn, D. I. Broadhurst, H. J. Atherton, R. Goodacre, og J. L. Griffin, «Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy», *Publishing*, s. 387–426, aug. 2012, doi: 10.1039/b906712b.
- [8] M. S. Monteiro, M. Carvalho, M. L. Bastos, og P. Guedes de Pinho, «Metabolomics Analysis for Biomarker Discovery: Advances and Challenges», *Bentham Sci. Publ.*, bd. 20, s. 257–271, 2013, doi: 10.2174/092986713804806621.
- [9] M. M. Rinschen, J. Ivanisevic, M. Giera, og G. Siuzdak, «Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, bd. 20, nr. 6, s. 353–367, jun. 2019, doi: 10.1038/s41580-019-0108-4.
- [10] L. Smith *mfl.*, «Important Considerations for Sample Collection in Metabolomics Studies with a Special Focus on Applications to Liver Functions», *Metabolites*, bd. 10, nr. 3, s. 1–17, mar. 2020, doi: 10.3390/metabo10030104.
- [11] C.-C. Chang *mfl.*, «The efficacy of semi-quantitative urine protein-to-creatinine (P/C) ratio for the detection of significant proteinuria in urine specimens in health screening settings», *SpringerPlus*, bd. 5, nr. 1, s. 1–5, okt. 2016, doi: 10.1186/s40064-016-3389-5.
- [12] H. B. Skogvold *mfl.*, «Bridging the Polar and Hydrophobic Metabolome in Single-Run Untargeted Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Dried Blood Spot Metabolomics for Clinical Purposes», *J. Proteome Res.*, bd. 20, nr. 8, s. 4010–4021, aug. 2021, doi: 10.1021/acs.jproteome.1c00326.

- [13] B. L. Therrell *mfl.*, «Current status of newborn screening worldwide: 2015», *Semin. Perinatol.*, bd. 39, nr. 3, s. 171–187, apr. 2015, doi: 10.1053/j.semperi.2015.03.002.
- [14] V. R. De Jesús, J. V. Mei, C. J. Bell, og W. H. Hannon, «Improving and Assuring Newborn Screening Laboratory Quality Worldwide: 30-Year Experience at the Centers for Disease Control and Prevention», *Semin. Perinatol.*, bd. 34, nr. 2, s. 125–133, apr. 2010, doi: 10.1053/j.semperi.2009.12.003.
- [15] W. Li og F. L. S. Tse, «Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules», *Biomed. Chromatogr.*, bd. 24, nr. 1, s. 49–65, 2010, doi: 10.1002/bmc.1367.
- [16] A. C. Schrimpe-Rutledge, S. G. Codreanu, S. D. Sherrod, og J. A. McLean, «Untargeted metabolomics strategies – Challenges and Emerging Directions», *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, bd. 27, nr. 12, s. 1897–1905, des. 2016, doi: 10.1007/s13361-016-1469-y.
- [17] K. Elgstøen og H. Rootwelt, «Metabolomikk; kunsten å se hele biokjemien! - Oslo universitetssykehus», *Oslo Univ.*, s. 2, nov. 2020.
- [18] «Biological Marker - an overview | ScienceDirect Topics».
<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/biological-marker> (åpnet 15. mai 2023).
- [19] W. B. Dunn, D. I. Broadhurst, H. J. Atherton, R. Goodacre, og J. L. Griffin, «Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy», *Chem Soc Rev*, bd. 40, nr. 1, s. 387–426, 2011, doi: 10.1039/B906712B.
- [20] G. A. N. Gowda og D. Raftery, «NMR Based Metabolomics», *Adv. Exp. Med. Biol.*, bd. 1280, s. 1–24, 2021, doi: 10.1007/978-3-030-51652-9_2.
- [21] A. Bouziani, M. Yahya, A. Bouziani, og M. Yahya, «Mass Spectrometry Coupled with Chromatography toward Separation and Identification of Organic Mixtures», i *Biodegradation Technology of Organic and Inorganic Pollutants*, IntechOpen, 2021, s. 1–12. doi: 10.5772/intechopen.100517.
- [22] S. A. Goldansaz, A. C. Guo, T. Sajed, M. A. Steele, G. S. Plastow, og D. S. Wishart, «Livestock metabolomics and the livestock metabolome: A systematic review», *PLoS One*, bd. 12, nr. 5, s. 1–26, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0177675.
- [23] «Harris - 2010 - Quantitative chemical analysis.pdf». Åpnet: 17. mai 2023. [Online]. Tilgjengelig på: http://orbitals.ir/wp-content/uploads/2017/01/Daniel-C.-Harris-Quantitative-Chemical-Analysis-8th-Edition-W.-H.-Freeman-2010-Www.Orbitals.ir_.pdf
- [24] Element, «Peak Tailing in HPLC», 2017. <https://www.crawfordscientific.com/chromatography-blog/post/peak-tailing-in-hplc> (åpnet 17. mai 2023).

- [25] D. C. Harris og C. A. Lucy, «Quantitative Chemical Analysis 10th Edition», New York, 2020, s. 707–711.
- [26] Agilent, «Pursuit, XRs, and XRs Ultra Columns for Reverse Phase HPLC | Agilent». <https://www.agilent.com/en/product/small-molecule-columns/reversed-phase-hplc-columns/pursuit-xrs-xrs-ultra> (åpnet 17. mai 2023).
- [27] H. Awad, M. M. Khamis, og A. El-Aneed, «Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization», *Appl. Spectrosc. Rev.*, bd. 50, nr. 2, s. 158–175, feb. 2015, doi: 10.1080/05704928.2014.954046.
- [28] P. O. Rønning, «Innføring i massespektrometri», OsloMet-storbyuniversitet, s. 12–13.
- [29] A. Michalski *mfl.*, «Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer», *Mol. Cell. Proteomics MCP*, bd. 10, nr. 9, s. 1–11, sep. 2011, doi: 10.1074/mcp.M111.011015.
- [30] C. Proteomics, «Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer», *Creative Proteomics*. <https://www.creative-proteomics.com/support/q-exactive-hybrid-quadrupole-orbitrap-mass-spectrometer.htm> (åpnet 16. mai 2023).
- [31] Creative Proteomics, «Data Dependent Acquisition and Data Independent Acquisition Mass Spectrometry», *Creative Proteomics Blog*, 17. mai 2019. <https://www.creative-proteomics.com/blog/data-dependent-acquisition-and-data-independent-acquisition-mass-spectrometry/> (åpnet 16. mai 2023).
- [32] Wageningen, «Q ExactivePlus Orbitrap LC-MS/MS», *WUR*, 17. juni 2014. <https://www.wur.nl/en/product/q-exactiveplus-orbitrap-lc-msms.htm> (åpnet 16. mai 2023).
- [33] D. Broadhurst *mfl.*, «Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies», *Metabolomics*, bd. 14, nr. 6, s. 1–17, mai 2018, doi: 10.1007/s11306-018-1367-3.
- [34] Dr. J. Thode, «What are system suitability tests (SST) of analytical methods?», 28. juli 2018. <https://mpl.loesungsfabrik.de/en/english-blog/method-validation/sst> (åpnet 11. mai 2023).
- [35] PubChem, «PubChem», 2004. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (åpnet 5. mai 2023).
- [36] J. Lever, M. Krzywinski, og N. Altman, «Principal component analysis», *Nat. Methods*, s. 641–642, jul. 2017, doi: 10.1038/nmeth.4346.
- [37] I. T. Jolliffe og J. Cadima, «Principal component analysis: a review and recent developments», *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.*, bd. 374, nr. 2065, s. 1–16, apr. 2016, doi: 10.1098/rsta.2015.0202.
- [38] M. Hur *mfl.*, «A global approach to analysis and interpretation of metabolic data for plant natural product discovery», *Nat. Prod. Rep.*, bd. 30, nr. 4, s. 565–583, apr. 2013, doi: 10.1039/c3np20111b.

- [39] K. Hu, «Become Competent within One Day in Generating Boxplots and Violin Plots for a Novice without Prior R Experience», *Methods Protoc.*, bd. 3, nr. 4, s. 1–30, sep. 2020, doi: 10.3390/mps3040064.
- [40] V. L. Li *mfl.*, «An exercise-inducible metabolite that suppresses feeding and obesity», *Nature*, s. 785–790, jun. 2022, doi: 10.1038/s41586-022-04828-5.
- [41] H. S. Haugan, «Investigating the Lipid Coverage of the Dried Blood Spot Metabolome using Liquid Chromatography – Mass Spectrometry for Global Metabolomics», *Dep. Chem. Fac. Math. Nat. Sci. - Univ. Oslo*, s. 1–169, 2020.
- [42] S. H. Zeisel og K.-A. da Costa, «Choline: an essential nutrient for public health», *Nutr. Rev.*, s. 615–623, nov. 2009, doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00246.x.
- [43] J. A. Kurtz, T. A. VanDusseldorp, J. A. Doyle, og J. S. Otis, «Taurine in sports and exercise», *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, bd. 18, s. 1–20, mai 2021, doi: 10.1186/s12970-021-00438-0.
- [44] K. Sahlin, M. Tonkonogi, og K. Soderlund, «Plasma hypoxanthine and ammonia in humans during prolonged exercise», *Stockh. Univ. Coll. Phys. Educ. Sports*, s. 417–422, mai 1999.
- [45] H. Jakubowski og P. Flatt, «13: Glycolysis, Gluconeogenesis, and the Pentose Phosphate Pathway», *Biology LibreTexts*, 2. desember 2018.
[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Fundamentals_of_Biochemistry_\(Jakubowski_and_Flatt\)/02%3A_Unit_II-_Bioenergetics_and_Metabolism/13%3A_Glycolysis_Gluconeogenesis_and_the_Pentose_Phosphate_Pathway](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Fundamentals_of_Biochemistry_(Jakubowski_and_Flatt)/02%3A_Unit_II-_Bioenergetics_and_Metabolism/13%3A_Glycolysis_Gluconeogenesis_and_the_Pentose_Phosphate_Pathway) (åpnet 9. mai 2023).
- [46] M. J. Rennie og K. D. Tipton, «Protein and amino acid metabolism during and after exercise and the effects of nutrition», *Annu. Rev. Nutr.*, bd. 20, s. 457–483, 2000, doi: 10.1146/annurev.nutr.20.1.457.
- [47] J. Henriksson, «Effect of Exercise on Amino Acid Concentrations in Skeletal Muscle and Plasma», *J. Exp. Biol.*, s. 149–165, okt. 1991, doi: 10.1242/jeb.160.1.149.
- [48] R. F. Ranallo og E. C. Rhodes, «Lipid Metabolism During Exercise», *Sports Med.*, bd. 26, nr. 1, s. 29–42, jul. 1998, doi: 10.2165/00007256-199826010-00003.
- [49] J. W. Starnes *mfl.*, «Exercise-Induced Alterations in Skeletal Muscle, Heart, Liver, and Serum Metabolome Identified by Non-Targeted Metabolomics Analysis», *Metabolites*, bd. 7, nr. 3, s. 1–14, aug. 2017, doi: 10.3390/metabo7030040.
- [50] G. D. Lewis *mfl.*, «Metabolic Signatures of Exercise in Human Plasma», *Sci. Transl. Med.*, bd. 2, nr. 33, s. 1–26, mai 2010, doi: 10.1126/scitranslmed.3001006.
- [51] S. Velghe, L. Delahaye, og C. P. Stove, «Is the hematocrit still an issue in quantitative dried blood spot analysis?», *J. Pharm. Biomed. Anal.*, s. 188–196, jan. 2019, doi: 10.1016/j.jpba.2018.10.010.

Vedlegg

Vedlegg A – Søknad til Regional komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk

En søknad til Regional komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk ble sendt inn for undersøkelse av det normale metabolomet. Det informerte skjemaet om samtykke gitt til forsøkspersonene er beskrevet nedenfor.



Forespørsel om deltakelse i forskningsprosjektet

KARTLEGGING AV NORMALMETABOLOMET

Delprosjekt: Endringer i metabolomet ved fysisk aktivitet

Dette er et spørsmål til deg om å delta i et forskningsprosjekt som har til hensikt å undersøke sammensetningen av stoffene som kan påvises i kroppsvæsker i en normalbefolkning. Metabolismen er summen av alle kjemiske reaksjoner i kroppen og innebærer nedbrytning og oppbygging av ulike stoffer som inngår i prosessene som skjer i kroppen. Stoffene som deltar i metabolismen kalles metabolitter, og sammensetningen av metabolitter utgjør det som kalles metabolomet.

Metabolismen er et dynamisk system, det vil si det er i endring hele tiden, og påvirkes av en rekke naturlige biologiske faktorer slik som alder, kjønn, tid på døgnet, og ytre påvirkninger slik som matinntak/faste, fysisk aktivitet, sykdom, inntak av legemidler m.m.

For å kunne skille variasjoner i metabolomet som skyldes normale prosesser fra avvik som skyldes sykdom er det nødvendig å undersøke metabolomet fra et stort antall friske personer under ulike betingelser (f.eks. tid på døgnet, fødeinntak, fysisk aktivitet).

Forskningsansvarlig er Oslo Universitetssykehus, Avdeling for medisinsk biokjemi ved avdelingsleder. Prosjektleder er Katja B. Prestø Elgstøen ved samme avdeling.

Hva innebærer PROSJEKTET?

Hensikten med dette prosjektet er å studere endringer i metabolomet ved fysisk aktivitet. Derfor ønsker vi å ta prøve av deg før, under og etter trening.

Vi undersøker blod, i form av «dried blood spots», som er tørkede blodflekker på filterpapir. Det vil bli et stikk i fingeren i forbindelse med blodprøvetaking. I noen tilfeller kan det være aktuelt å undersøke andre prøvematerialer (blodprøve i armen, urinprøve, svette el.l.)

I prosjektet vil vi innhente og registrere følgende opplysninger om deg: kjønn og alder. Det er også ønskelig å registrere annen relevant informasjon, for eksempel om du har et spesielt kosthold (vegetarianer e.l.), kjente sykdommer, medisinbruk osv., men du står helt fritt til å oppgi denne informasjonen.

Det kan være aktuelt å gjøre relevante undersøkelser på gennivå for å bidra til forståelsen av variasjoner i metabolomet.

Mulige fordeler og ulemper

Du vil ikke ha noen spesielle fordeler av forsøkene, men erfaringer/resultater fra forsøkene vil øke vår kunnskap om normalmetabolomet og dermed gjøre det lettere å oppdage avvik fra normalen. Dette vil være viktig i forståelsen av helse og sykdom og i framtidens diagnostikk og behandling.

Frivillig deltakelse og mulighet for å trekke sitt samtykke

Det er frivillig å delta i prosjektet. Dersom du ønsker å delta, undertegner du samtykkeerklæringen på siste side. Der vil det bli spurt spesifikt om a) deltakelse i denne studien om endringer i metabolomet ved fysisk aktivitet og b) om det kan utføres relevante analyser på gennivå knyttet til endring av metabolomet ved fysisk aktivitet.

Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke ditt samtykke. Dersom du trekker deg fra prosjektet, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og opplysninger, med unntak av opplysninger som allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner. Dersom du ønsker å trekke deg eller har spørsmål til prosjektet, kan du kontakte Katja B. P. Elgstøen (kelgstoe@ous-hf.no, tlf. 23073079).

Hva skjer med informasjonen om deg?

Informasjonen som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med studien. Du har rett til innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg og rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene som er registrert.

Alle opplysningene vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennbare opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger gjennom en navneliste. Det er kun autorisert personell knyttet til prosjektet som har adgang til navnelisten og som kan finne tilbake til deg. Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres. Prosjektleder har ansvar for den daglige driften av forskningsprosjektet og at opplysninger om deg blir behandlet på en sikker måte. Informasjon om deg vil bli slettet senest fem år etter prosjektslutt.

Som i alle forskningsstudier som involverer biologisk materiale er det en viss risiko for at det oppdages noe i prøvene som kan være knyttet til sykdom eller risiko for å utvikle sykdom, såkalt utilsiktede funn. Alle prøver er imidlertid avidentifiserte, og ingen (verken forskere eller personer som deltar i prosjektet) informeres om resultater og funn hos enkeltpersoner.

Hva skjer med prøver som blir tatt av deg?

Prøvene som tas av deg skal oppbevares i en generell forskningsbiobank: Kartlegging av normalmetabolomet. Denne er lokalisert ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Rikshospitalet, Oslo Universitetssykehus. Katja B Prestø Elgstøen (kelgstoe@ous-hf.no, tlf. 23073079) er ansvarshavende for biobanken. Dette er en prospektiv biobank, og prøvene vil bli lagret til de eventuelt ønskes fjernet av deg. Det kan være aktuelt å sende prøver ut av landet (innad i EU og til USA, data som overføres til USA behandles i henhold til EUs Personverndirektiv) som et ledd i internasjonalt samarbeid. Materialet vil i så fall kun utleveres uten navn, fødselsnummer eller andre personidentifiserbare opplysninger.

Genetiske undersøkelser

Hva slags informasjon kan de genetiske undersøkelsene i PROSJEKTET gi?

Det kan være aktuelt å gjøre genetiske analyser på det materialet som er samlet inn for å se på sammenhengen mellom metabolomet og underliggende gener og genvarianter (sekvensering av enkeltgen, grupper av gener eller hele genomet). Genomsekvensen til hvert enkelt menneske er så unik at ingen prøver som inneholder DNA i teorien kan være anonyme. I praksis blir imidlertid alle prøver aidentifiserte og ingen (verken forskere eller personer som deltar i prosjektet) informeres om resultater og funn hos enkeltpersoner.

Godkjenning

Dine prøver inngår i biobank **2018/787 Kartlegging av normalmetabolomet** som er godkjent av Regional komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK).

Ingen analyser utføres før dette delprosjektet er godkjent av REK.

OPPLYSNINGER OM DEG

Kode for aidentifisering: _____

Alder:

Kjønn:

Andre opplysninger (frivillig å oppgi):

Faste medisiner:

Andre medisiner tatt siste døgn:

Eventuelle sykdommer:

Eventuelt spesielt kosthold (f.eks. vegetarianer, laktoseintolerant):

Røyker eller snuser du til vanlig?

Annen relevant informasjon:

Samtykke til deltakelse i PROSJEKTET kartlegging av normalmetabolomet –
studier av normalmetabolomet ved fysisk aktivitet

Jeg er villig til å delta i prosjektet:

- a) Jeg samtykker til deltakelse i denne studien om endringer i metabolomet ved fysisk aktivitet.

Sted og dato

Deltakers signatur

- b) Jeg godkjenner at det kan utføres relevante analyser på gennivå knyttet til endring av
metabolomet ved fysisk aktivitet.

Sted og dato

Deltakers signatur

Deltakers navn med blokkbokstaver

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om prosjektet.

Sted og dato

Signatur

Rolle i prosjektet

Vedlegg B - Oversikt over diett




En oversikt over diettplanen ble levert til hver deltaker i dette forsøket, samt et skjema som viste tidspunkter for når blodprøver skulle tas, når treningen skulle gjennomføres og når måltidene skulle spises.

Tabell B.1: En felles diettplan som ble fulgt av forsøkspersonene i løpet av tre dager. Diettplanen består av lunsj, middag, mellommåltid og kveldsmat.


Måltider:	Mat:	Drikke:
Dagens første måltid	Brødskive(r) med eggerøre (egg og salt), avokado, tomat, majones.	Vann + 1-2 kopper te 
Middag	Fjordland torsk.  + brødskive(r)	Vann + 1-2 kopper te 

Tabell B.1, fortsettelse: En felles diettplan som ble fulgt av forsøkspersonene i løpet av tre dager.

Diettplanen består av lunsj, middag, mellommåltid og kveldsmat.

Måltider:	Mat:	Drikke:
Mellommåltid	Byggryn med bringebær + banan. 	Vann
Kveldsmat	 Tomatsuppe + brødskive(r)	Vann + Bendit smoothie i smaken: blåbær og eple 250 ml. 

Tabell B.2: Skjema over dager, tidspunkt og observasjoner der deltakerne kunne kommentere dersom noe var blitt gjort annerledes enn planen.

DAG	Ca. tidspunkt	Prøve-ID	NB!	Faktisk tidspunkt	Kommentarer
1	08:55	F	Faste over natten		
	11:20	FL	Rett før lunsj		
	15:30	FM	Rett før middag		
	21:00	FK	Rett før kveldsmat		
2	08:55	F	Fastende før trening		
	09:00		Trening fastende		
	09:21	E1	Rett etter trening		

Tabell B.2, fortsettelse: Skjema over dager, tidspunkt og observasjoner der deltakerne kunne kommentere dersom noe var blitt gjort annerledes enn planen.

2	09:30	E10	10 minutter etter trening		
	09:50	E30	30 minutter etter trening		
	10:20	E60	1 time etter trening		
	11:20	FL	2 timer etter trening Rett før lunsj		
	15:30	FM	Rett før middag		
	21:00	FK	Rett før kveldsmat		
3	08:55	F	Faste over natten		

Vedlegg C – Sekvensfil som ble benyttet i forsøket

Oppsett av sekvensen som ble brukt til den allerede etablerte LC-MS/MS analysen, bestående av biologiske prøver, PQC, Sub-prøvene, SST og vann.

Tabell C.1: Sekvensen som ble brukt i analysen bestående av biologiske prøver, PQC og Sub-prøvene.

Injeksjonsnummer	Prøvetype	Kommentar
1	Systemsjekk bland	Vann
2	SST - start	Sjekker systemet før prøvene analyseres
3	Kondisjonering QC prøve 1	Brukes ikke i dataprosessering
4	Kondisjonering QC prøve 2	Brukes ikke i dataprosessering
5	Kondisjonering QC prøve 3	Brukes ikke i dataprosessering
6	PQC	
7	PQC	
8	Biologisk prøve 1	
9	Biologisk prøve 2	
10	Biologisk prøve 3	
11	Biologisk prøve 4	
12	Biologisk prøve 5	
13	PQC	
14	Biologisk prøve 1	
15	Biologisk prøve 2	
16	Biologisk prøve 3	
17	Biologisk prøve 4	
18	Biologisk prøve 5	
19	PQC	
20	Biologisk prøve 1	
21	Biologisk prøve 2	
22	Biologisk prøve 3	
23	Biologisk prøve 4	
24	Biologisk prøve 5	

Tabell C.1, fortsettelse: Sekvensen som ble brukt i analysen bestående av biologiske prøver, PQC og Sub-prøvene.

Injeksjonsnummer	Prøvetype	Kommentar
25	PQC	
26	Biologisk prøve 1	
27	Biologisk prøve 2	
28	Biologisk prøve 3	
29	Biologisk prøve 4	
30	Biologisk prøve 5	
31	PQC	
32	Biologisk prøve 1	
33	Biologisk prøve 2	
34	Biologisk prøve 3	
35	Biologisk prøve 4	
36	Biologisk prøve 5	
37	PQC	
38	PQC	
39	SST - slutt	