

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
SA TÛ KLIINIKUM, GENEETIKA- JA PERSONAALMEDITSIINI KLIINIK,  
LABORATOORSE GENEETIKA OSAKOND, AINEVAHETUSHAIGUSTE LABOR

Kaarina Kessel

**Metaboliitide stabiilsuse hindamine vereplasmas  
vedelikkromatograafia-massispektromeetria meetodil**

Magistritöö

30 EAP

Juhendajad: PhD Mihkel Ilisson,

Professor Ants Kurg

TARTU 2024

## **Infoleht**

### **Metaboliitide stabiilsuse hindamine vereplasmas vedelikkromatograafia-massispektromeetria meetodil**

**Kokkuvõte.** Metaboloomika eesmärk on tuvastada organismis sisalduv biomolekulide, metaboliitide, komplekt. Metaboliitide väärtuste reprodutseeritavust võivad mõjutada erinevad preanalüütilised tingimused. Vaatamata mitmekülgsetele uuringutele ei ole kirjanduse andmed kliinilise töövoos jaoks piisavad. Eestis on esmakordselt võimalus SA TÜK Geneetika ja personaalmeditsiini kliinikus kasutusele võtta QTOF massispektromeeter, et seda rakendada kliinilisteks analüüsideks. Seetõttu on vajalik saadavaid tulemusi kontrollida ja võrrelda kirjanduses avaldatutega. Magistritöö üldine eesmärk oli välja selgitada sobivad vereplasma säilitustingimused - säilitades alikvooditud materjali kolmel erineval temperatuuril ja analüüsides neljas erinevas ajapunktis. Töö tulemused toetavad teooriat, mille kohaselt esineb metaboliitide hulgas ebastabiilseid analüüte, mis vajavad standardiseeritud preanalüütikat.

**Märksõnad:** metaboloomika, preanalüütika, stabiilsus, LC-MS,

**CERCS kood:** B110 Bioinformaatika, meditsiiniinformaatika, biomatemaatika, biomeetrika, B190 Kliiniline keemia, B725 Diagnostika

### **Evaluation of Metabolite Stability in Blood Plasma Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry**

**Summary.** The aim of metabolomics is to identify the set of metabolites in an organism. Various pre-analytical conditions can affect metabolite value reproducibility. Despite extensive studies, literature data is insufficient for clinical workflows. In Estonia, the QTOF mass spectrometer can be introduced at Tartu University Hospital's Clinic of Genetics and Personalized Medicine for clinical analyses. Therefore, results need validation and comparison with published data. This master's thesis aimed to determine suitable blood plasma storage conditions by storing aliquots at three temperatures and analysing them at four time points. The results support the theory that some metabolites are unstable and require standardised pre-analytics.

**Keywords:** Metabolomics, preanalytics, stability, LC-MS

**CERCS Code:** B110 Bioinformatics, medical informatics, biomathematics, biometrics, B190 Clinical chemistry, B725 Diagnostics

## Sisukord

<b>Infoleht</b> .....	<b>2</b>
<b>Sisukord</b> .....	<b>3</b>
<b>Kasutatud lühendid</b> .....	<b>4</b>
<b>Sissejuhatus</b> .....	<b>5</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Metaboolika</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 Tuumamagnetresonantsi spektroskoopia ja massispektrometria</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3 Sihtmärgistatud ja sihtmärgistamata metaboolika</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4 Kliinilised metaboolika uuringud</b> .....	<b>11</b>
1.5 Preanalüütika.....	13
1.5.1 Proovimaterjali valik.....	14
1.5.2 Verekatsuti valik.....	14
1.5.3. Paastumine.....	15
1.5.4 Proovivõtu aeg.....	17
1.5.5 Hemolüüs.....	17
1.5.6 Tsentrifugimine.....	18
1.5.7 Alikvootimine.....	19
1.5.8 Plasma säilitamine.....	20
<b>2. EKSPERIMENTAALOSA</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 Töö eesmärgid</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2 Materjalid ja meetodika</b> .....	<b>24</b>
2.2.1 Proovide kogumine ja ettevalmistamine.....	24
2.2.2 Meetodi optimeerimine.....	25
2.2.3 Analüüsi teostamine.....	27
2.2.4 T-Test ja Benjamini-Hochbergi korrigeerimine.....	29
<b>2.3 Tulemused ja arutelu</b> .....	<b>31</b>
<b>Kokkuvõte</b> .....	<b>46</b>
<b>Summary</b> .....	<b>48</b>
<b>Tänuõnad</b> .....	<b>50</b>
<b>Kasutatud kirjandus</b> .....	<b>51</b>
<b>Kasutatud veebiaadressid</b> .....	<b>56</b>
<b>Lisad</b> .....	<b>57</b>
Lisa 1. Tulemused.....	57
<b>Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks</b> .....	<b>67</b>

## **Kasutatud lühendid**

Da - dalton - mõõtühik, mida kasutatakse aatomite ja molekulide massi väljendamiseks

IS - sisestandard (ingl *internal standard*)

CV - variatsioonikoefitsient (ingl *Coefficient of variation*)

ESI - elektropihustusionisatsioon

GC-MS - gaasikromatograafia-massispektromeetria (ingl *Gas chromatography–mass spectrometry*)

MS - massispektromeetria (ingl *mass spectrometry*)

LC-MS - vedelikkromatograafia-massispektromeetria (ingl *Liquid chromatography–mass spectrometry*)

LoD - avastamispiir (ingl *limit of detection*)

NMR - tuumamagnetresonantsi spektroskoopia (ingl *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*)

QTOF - kvadrupool-lennuaja massispektromeeter (ingl *Quadrupole Time-of-Flight - QToF*)

SA TÜK - Sihtasutus Tartu Ülikooli Kliinikum

SD - standardhälve (ingl *standard deviation*)

## Sissejuhatus

Metaboloomika on osa oomikast ning selle eesmärk on tuvastada organismis sisalduv biomolekulide komplekt, metaboliidid, mis esindavad kõige paremini molekulaarset fenotüüpi. Inimese metaboloom on keeruline, dünaamiline ja muutustele reageeriv. Metaboliitide kontsentratsioonid muutuvad kiiresti vastusena füsioloogilistele muutustele ja annavad olulist infot biokeemilises radades toimuva kohta kindlal ajahetkel.

Metaboloomika abil saab analüüsida nii kudesid, rakke kui ka kehavedelikke: uriin, veri, sülg, tserebrospinaalvedelik, bronhoalveolaarne loputusvedelik. Meetodit rakendatakse erinevates valdkondades bioloogiliste süsteemide funktsionaalsuse käsitlemiseks. Metaboloomikat on praktiseeritud juba aastakümneid ja selle oluliseks eesmärgiks on omistada metaboliitidele bioloogilised tähendused ja astuda nii lähemale haiguse mehhanismide väljaselgitamisele.

Metaboliitide reprodutseeritavust proovides võivad mõjutada erinevad preanalüütilised tingimused. Metaboliitide stabiilsuse väljaselgitamiseks on läbi viidud mitmeid uuringuid, kuid need ei ole kliinilise töövoos jaoks piisavad. Nüüd on võimalus esmakordselt Eestis SA TÜK Geneetika ja personaalmeditsiini kliinikus kasutusele võtta QTOF massispektromeeter. Eesmärk on analüsaator kaasata kliinilisse töösesse, et pakkuda täpsemaid ja uusimaid analüüsivõimalusi geneetiliste haiguste varajaseks avastamiseks ning monitoorimiseks. Selleks on vajalik läbi viia erinevaid meetodika arenduse etappe.

Magistritöös uuriti metaboliitide stabiilsust. Eksperimentaalse osa üldine eesmärk oli välja selgitada vereplasma sobivad säilitustingimused - säilitades alikvooditud materjali kolmel erineval temperatuuril (4 °C, -20 °C, -80 °C) ja analüüsides neljas erinevas ajapunktis (0 päeva, 7 päeva, 28 päeva, 56 päeva). Uurimustöö käigus kontrolliti kirjanduses olevaid andmeid ja võrreldi saadud tulemustega, et välja selgitada plasmade optimaalne säilitustemperatuur. Magistritöös analüüsiti, kas plasmade lühiajaline säilitamine kõrgemal temperatuuril kui -80 °C mõjutab metaboliitide kontsentratsioone. Eksperiment aitas optimeerida meetodit, mida saab hiljem rakendada kliinilises töös.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Metaboloomika

Oomika metoodikate eesmärk on bioloogiliste süsteemide mitmetasandiline iseloomustamine, et tuvastada rakus, koes või organismis sisalduv biomolekulide komplekt, tekitades suurel hulgal andmeid, mida hiljem hinnata bioinformaatika ja statistika vahenditega (Tebani jt., 2016, Klassen jt., 2017). Selline lähenemine pakub Tebani jt. (2016) andmetel võimalusi haiguste sõeluuringuks, diagnoosimiseks ja ravi jälgimiseks. Oomika metoodikate hulka kuuluvad Klassen jt. (2017) järgi genoomika, transkriptoomika, proteoomika ja metaboloomika, millest viimane on uudseim valdkond.

Metaboliitide suhtelise kontsentratsiooni muutust mõõdeti 1998. aastal, vaadeldes seda nii geeni deletsiooni kui üleekspressiooni korral ning see tõi kirjandusse mõiste “metaboloom”, mida kasutati kogu organismi sünteesitud metaboliitide kohta (Oliver jt., 1998). Esimesed metaboolsed uuringud teostati Oliver jt (1998) andmetel pärmi rakkudega. Organismi metaboloomi moodustab Yanes jt. (2020) põhjal orgaaniliste ühendite, metaboliitide komplekt, mis pärineb elusorganismides toimuvate keemiliste reaktsioonide jadast, st ühe biokeemilise reaktsiooni produkt saab substraadiks teistele reaktsioonidele, tagamaks nii organismi elutegevuseks vajalikke sisetingimusi. Metaboliidid on madala molekulmassiga (50-1500 daltonit (Da)) biokeemilised ühendid, mis peegeldavad rakkude ja kudede biokeemilist olekut, esindades kõige paremini molekulaarset fenotüüpi (Yanes jt., 2020, Fomenko jt., 2022).

Inimese metaboloom on keeruline, dünaamiline ja muutustele reageeriv. Metaboliitide kontsentratsioonid muutuvad kiiresti vastusena füsioloogilistele muutustele ja annavad olulist infot biokeemilises radades toimuva kohta kindlal ajahetkel (Tebani jt., 2016). Mitmed metaboliidid juhivad olulisi raku funktsioone: energia tootmine ja salvestamine, signaaliülekanne ja apoptoos (Johnson jt., 2016). Rakkudes, biovedelikes, kudedes ja organismides esinevaid väikesi molekule uurib metaboloomika, liigitades need endogeenseteks ja eksogeenseteks, millest esimesed tekivad kehas toimuvate reaktsioonide käigus, teised aga pärinevad mikroorganismidest või saadakse toitainete ja ravimite tarbimisel (Johnson jt., 2016, Rahman jt., 2023). Metaboliitide biokeemilised toimed on väga ulatuslikud (Johnson jt., 2016) ning muutused endogeensetes metaboliitides peegelduvad fenotüübis, andes olulist informatsiooni patoloogilise seisundi diagnoosimisel, haiguse progresseerumisel ja ka ravitõhususe hindamisel (Rahman jt., 2023).

Metaboliitide hulka kuuluvad Rahman jt. (2023) järgi mitmekesise struktuuri ja biokeemiliste omadustega aminohapped, peptiidid, lipiidid ja süsivesikud, lämmastikalused ja vitamiinid, mis on mõjutatud nii geneetilistest kui keskkonna teguritest. Metaboloomika abil saab analüüsida nii kudesid, rakke kui ka kehavedelikke: uriin, seerum, plasma, sülg, tserebrospinaalvedelik, bronhoalveolaarne loputusvedelik (Dunn, 2011, Johnson jt., 2016, Chetwynd jt., 2017, Rahman jt., 2023). See on muutumas üheks võimsamaks bioloogiliste süsteemide funktsionaalsuse käsitlemise lähenemisviisiks erinevates valdkondades: kliinilistes ja biomeditsiinilistes uuringutes, toksikoloogias, farmakoloogias, samuti toidu- ja keskkonnateaduses (Alseekh, 2021). Metaboloomikat on praktiseeritud juba aastakümneid ja selle oluliseks eesmärgiks on omistada metaboliitidele bioloogilised tähendused ja astuda nii lähemale haiguse mehhanismide väljaselgitamisele (Johnson jt., 2016, Alseekh jt., 2021).

## 1.2 Tuumamagnetresonantsi spektroskoopia ja massispektromeetria

Tavaliselt tehakse metaboliitide analüüs kahe analüütilise platvormi abil: tuumamagnetresonantsi (NMR - *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*) spektroskoopia ja vedelik- (LC-MS - *Liquid chromatography–mass spectrometry*) või gaasikromatograafia (GC-MS - *Gas chromatography–mass spectrometry*), millele järgneb massispektromeetiline analüüs (Fomenko jt., 2022), need platvormid peaksid tagama kõrge spetsiifilisuse ja tundlikkuse (Rahman jt., 2023). Igal uuringu meetodil on omad eelised ja puudused, järgnevalt tuuakse välja nende peamised omadused. Lühemalt on need kirjeldatud ka tabelis (Tabel 1).

NMR spektroskoopia on metaboolsete uuringute jaoks sobiv meetod tänu oma suurele reprodutseeritavusele, lihtsale proovide ettevalmistamisele ja võimalusele mõõta erinevaid väikese molekuliga metaboliite (Tebani jt., 2016, Rahman jt., 2023). Seda peetakse Klassen jt. (2017) andmetel universaalseks metaboliitide tuvastamise tehnikaks, kus proove saab analüüsida otse minimaalse ettevalmistusega ja samaaegselt mõõta paljusid metaboliitide klasse. Eelistena toovad Rahman jt. (2023) välja reaalsajas ja kontrollitud temperatuuril toimuvad mõõtmised, mis sobivad nii vedelikele kui tahketele proovimaterjalidele ning see võimaldab tuvastada enamikku orgaanilisi aineklasse. Puudusteks on NMR puhul madal tundlikkus (Tebani jt., 2016, Klassen jt., 2017), kallis aparatuur ja metaboliitide vähene katvus (Rahman jt., 2023). Samuti peetakse puudusteks spektraalset keerukust ja signaalide katvust teatud spektripiirkondades, mis muudab selge identifitseerimise keeruliseks (Klassen jt., 2017). NMR kasutatakse Rahman jt. (2023)

andmetel peamiselt prekliinilistes sõeluuringute laborites, et varakult diagnoosida metaboolset sündroomi uriinist, seerumist või plasmast.

Massispektromeetria (*MS - mass spectrometry*) on NMR-iga võrreldes tundlikum ja spetsiifilisem, määrates molekulide identiteeti nende massi kaudu (Klassen jt., 2017, Johnson jt., 2016). MS nõuab eelnevat eraldamise etappi, mis on oluline proovi keerukuse vähendamiseks ja ionisatsiooni pärssimise mõjude minimeerimiseks, suurendades seeläbi tuvastamise tundlikkust ja suurendades metaboolsete ainete katvust (Klassen jt., 2017, Alseekh jt., 2021). Erinevad eraldamistehnikad: gaaskromatograafia (*GC - Gas chromatography*), kõrgjõudlusega vedelikkromatograafia (*HLPC - High-performance liquid chromatography*) või üliefektiivne vedelikkromatograafia (*UPLC - Ultra-performance liquid chromatography*) ja kapillaarelektroforees (*CE - Capillary electrophoresis*) (Klassen jt., 2017). Kuna proovimaterjalid võib esineda tuhandeid erinevaid ioone, minimeerib Johnson jt. (2016) järgi kromatograafilise eraldamine enne massispektromeetrisse sisenemist signaali summutamise. Seeläbi suurendatakse tundlikkust, mis võib veelgi paremini aidata kaasa metaboliitide tuvastamisele (Johnson jt., 2016). Massispektromeetria iseloomustab kõrge tundlikkus ja hilisemat andmeanalüüsi toetav spetsiaalne tarkvara (Dunn, 2011). Tegemist on mittekvantitatiivse analüsaatoriga, mis nõuab kalibreerimist (Dunn, 2011). Rahman jt. (2023) andmetel ei saa seda kasutada mittelahustuvate proovimaterjalide korral ning uue ühendi tuvastamine võib osutuda keeruliseks.

GC-MS sobib hästi madalmolekulaarsete (<650 Da) ja lenduvate metaboliitide jaoks (Dunn, 2011). Tänu derivatiseerimisele ehk funktsionaalrühma modifitseerimisele saab GC-MS-iga määrata ka erinevaid polaarseid ja kõrge keemistemperatuuriga metaboliite (Klassen jt., 2017). GC-MS on suurepärase tundlikkusega, mille avastamispiir (*limit of detection, LoD*) ehk madalaim analüüdi kontsentratsioon, mida on võimalik meetodikaga usaldusväärselt tuvastada (Leito ja Viitak, 2007), on nanomolaarses suurusjärgus (Dunn, 2011). Sellele seadmele on Rahman jt. (2023) põhjal iseloomulik lai metaboliitide katvus, lihtne proovide ettevalmistus ning hilisemat andmeanalüüsi toetav eritarkvara. Analüsaatorit kasutatakse põhjaliku metabooloomika analüüsi teostamiseks (Rahman jt., 2023).

LC-MS-il põhinevad metabooloomika meetodid võimaldavad tavapärastel tuvastada ligikaudu 500 - 1000 erinevat metaboliiti (Rahman jt., 2023). Kromatograafiliste meetodite puhul on signaali intensiivsus sõltuv iga metaboliidi ionisatsiooniefektiivsusest ja sisestatava lahuse kogusest

(Leito ja Viitak, 2007, Fomenko jt. 2022). Seetõttu võib Fomenkot jt. (2022) järgi kontsentratsioonide kvantitatiivne mõõtmine proovis olla üsna keeruline. Sel põhjusel kasutatakse LC-MS meetodit sageli eksperimentaalsete ja kontrollproovide metaboolsete profiilide võrdlemiseks (Fomenko jt., 2022). Massispektromeetrias saab Dunn (2011) andmetel metaboliitide tuvastamiseks kasutada ka kahte erinevat ionirežiimi: positiivset ja negatiivset. Nendes ionirežiimides ioniseeruvad erinevad molekulid, millel on võime loovutada või vastu võtta prootoneid, saades seeläbi positiivse või negatiivse laengu (Dunn, 2011). Positiivse režiimiga tuvastatakse näiteks amiine, fenole ja steroide ning negatiivses ionirežiimis ioniseeruvad molekulid on karboksüülhapped, fosfaadid ja sulfaadid (Dunn, 2011). Mitme tehnoloogia kombineerimine laiendab metaboliitide ulatust ja uuritavate proovide tüüpe (Rahman jt., 2023).

**Tabel 1.** Metaboloomika analüüsi platvormid

	<b>Eelised</b>	<b>Puudused</b>	<b>Rakendamine</b>
<b>NMR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lihtne proovide ettevalmistus</li> <li>• Sobib erinevatele proovimaterjalidele</li> <li>• Tuvastab enamiku orgaanilisi aineklasse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Madal tundlikkus</li> <li>• Madal metaboliitide katvus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prekliinilised uuringud</li> </ul>
<b>GC-MS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hea tundlikkus</li> <li>• Seotud andmeanalüüsi tarkvaradega</li> <li>• Lai metaboliitide katvus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nõuab kalibreerimist</li> <li>• Tahked proovimaterjalid ei sobi</li> <li>• Absoluutne kvantiseerimine keeruline</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Madal-molekulaarsed metaboliidid (&lt;650 Da)</li> </ul>
<b>LC-MS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lai metaboliitide katvus</li> <li>• Hea avastamispiir (LoD – 0.5 nM)</li> <li>• Seotud andmeanalüüsi tarkvaradega</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absoluutne kvantiseerimine keeruline</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Põhjalik metaboloomika analüüs</li> </ul>

### 1.3 Sihtmärgistatud ja sihtmärgistamata metabooloomika

Kasutatud tehnikate põhjal jaotatakse metabooloomika kahte põhikategooriasse: globaalne ehk sihtmärgistamata (*untargeted*) ja sihtmärgistatud (*targeted*) (Rahman jt., 2023, Johnson jt., 2016). Lähenemisviisi valik määrab, kuidas toimub katse kavandamine, proovide ettevalmistamine ja milliseid analüütilisi meetodeid kasutatakse (Alseekh jt., 2021). Sihtmärgistamata meetodi abil on võimalik patsiente ilma taustteadmisteta profiilida, leida uusi potentsiaalseid biomarkereid ja jõuda eesmärgiväliste leidudeni (Johnson jt., 2016, Coene jt., 2018). Tavaliselt kasutatakse Rahman jt. (2023) järgi sellist võimalust uurimistöös hüpoteeside loomiseks. Metaboliitide tüüpe mõjutavad ka valitud ekstraheerimis- ja analüüsimeetod, kuid tulemuseks on alati suur andmekogum, mis nõuab hilisemat analüüsiprotsessi (Johnson jt., 2016). Nii on Klassen jt. (2017) andmetel võimalik leida metaboliitide seosed erinevate metaboolsete radade vahel ja ka võimalik seos fenotüübiga. Sihtmärgistamata metabooloomika peamiseks kitsaskohaks peetakse Tautenhahn jt. (2012) põhjal suurt analüüsitavate andmete hulka. Kuid mõõtetulemuste analüüsi kiirendab ligipääs erinevatele metaboliitide andmebaasidele/raamatukogudele, hõlbustades seeläbi ka üldist töövoogu (Tautenhahn jt., 2012). Kuna selle meetodikaga on võimalik analüüsida väga laia metaboliitide spektrit, on selle eelduseks kõrge eraldusvõimega massispektromeetri kasutamine (Johnson jt., 2016).

Teiseks lähenemisviisiks on sihtmärgistatud metabooloomika, mida määratletakse kui kvantitatiivset või poolkvantitatiivset analüüsi metaboliitidele või metaboolsetele substraatidele, mis võivad olla seotud kindlate ainevahetusradadega või spetsiifiliste keemiliste/biokeemiliste omadustega (Tebani jt., 2016, Klassen jt., 2017). See lähenemisviis pakub Johnson jt. (2016) andmetel sihtmärgistamata metabooloomikast paremat tundlikkust ja selektiivsust, mis on meetoodika võime eristada analüüsitav komponent teistest ning mõõta selle kontsentratsiooni (Leito ja Viitak, 2007). Samas aga eeldab sihtmärgistatud metabooloomika varasemaid teadmisi, et püstitada uurimishüpotees või koostada spetsiifilistes bioloogilistes radades esinevate metaboliitide profiil (Tebani jt., 2016, Klassen jt., 2017). Metaboolse profiili koostamine sai Klassen jt. (2017) põhjal võimalikuks kõrge eraldusvõimega massispektromeetrite kasutusele võtmisega, kus metaboliite analüüsitakse mõne sekundiliste tsüklitena mitme tunni jooksul. Sihtmärgistatud lähenemisviisi kasutatakse Rahman jt. (2023) järgi ravi või geneetiliste modifikatsioonide efekti uurimisel kindlale ensüümile, lisaks ka farmakokineetilistes uuringutes. Välja on ka toodud kolmas lähenemisviis, osaline sihtmärgistatud (*semi-targeted*) analüüs, mille

käigus kvantifitseeritakse sadu teada olevaid metaboliite ning samaaegselt tuvastatakse ka hüpoteesi väliselt leitud analüüte (Rahman jt., 2023). Kõik lähenemisviisid järgivad sarnast proovide analüüsimise jada (Klassen jt., 2017).

Metaboliitide määramiseks bioloogilisest materjalist ehk metabotüüpiseerimiseks saab Rahman jt. (2023) järgi kasutada erinevaid analüüsistrateegiaid: metaboolsete sõrmejälgede (*fingerprinting*), jalajälgede võtmine (*footprinting*) ja metaboolse profiili koostamine. Metaboolsete sõrmejälgede määramist kasutatakse peamiselt sihtmärgistamata metaboolikas, kus saab määrata kõik metaboliitide signaalid, mis esindavad organismi seisundit konkreetsel ajahetkel (Rahman jt., 2023). Selle strateegia eesmärk ei ole üksikute metaboliitide eraldamine, vaid analüüsi käigus kogutakse proovide spektrid, mille tulemusi võrreldakse statistiliste meetodite abil ja leitakse proove eristavad spektriirakonnad (Chetwynd jt., 2017). Saadud spetsiifiline muster kirjeldab metaboliitide taseme muutusi konkreetsete süsteemide tingimustes (Rahman jt. 2023). Klassen jt. (2017) toovad välja, et metaboolse jalajälje strateegiat rakendatakse peamiselt mikrobioloogilistes ja molekulaarbioloogia uuringutes, et tuvastada söötmes oleva raku eritatud metaboliite. Tervikliku metaboolse profiili koostamist, kus mõõdetakse kindlaksmääratud metaboliite, rakendatakse näiteks vastsündinutel kaasasündinud ainevahetushäirete (*inborn errors of metabolism*) kahtluse korral, kasutades sihtmärgistatud analüüse (Tautenhahn jt., 2012, Coene jt., 2018).

#### **1.4 Kliinilised metaboolomika uuringud**

Üha enam rakendatakse kliinilises diagnostikas kogu eksoomi sekveneerimise tulemusi ja see on Coene jt. (2018) andmetel omakorda tekitanud vajaduse geneetiliste variantide funktsionaalse tõlgendamise järele. Kaasasündinud ainevahetushäired on geneetilised muutused, mis on Tebani jt. (2016) järgi küll harva esinevad, kuid olulise mõjuga, sest põhjustavad füüsiliste ja neuroloogiliste kahjude teket. Need on Lanpher jt. (2006) põhjal tingitud biokeemilise raja defektidest, mis on põhjustatud ensüümi, selle transporterite või kofaktori puudulikkusest, põhjustades substraadi kuhjumist või puudumist, võides hõlmata seejuures peaaegu kõiki organeid ja süsteeme. Kliinilised sümptomid võivad olla mittespetsiifilised ja seetõttu on nende testimine ja varajane diagnoosimine äärmiselt oluline (Wikoff jt., 2007, Tebani jt., 2016). Kliinilised nähud on suuresti mõjutatud keskkonnategurite poolt ja võivad seega ilmnedagi inimese igas vanuses (Lanpher jt., 2006). Teostatakse küll erinevaid vastsündinute sõeluuringuid, kuid

Coene jt, (2018) põhjal rutiinsed uuringud kahjuks kõiki ravitavaid kaasasündinud ainevahetushäireid ei kata. Piiratud valiku metaboolsete radade uurimine takistab uute defektide avastamist ja seetõttu ei jõuta alati õige diagnoosini (Coene jt., 2018). Lanpher jt. (2006) toovad välja, et sama geneetilise muutuse korral on täheldatud erinevaid fenotüüpe. Analüüsimiseks on levinud sihtmärgistatud paneelid, mis Coene jt. (2018) andmetel põhinevad erinevatel analüütilistel tehnikatel ja nõuavad seetõttu laboritelt erinevaid analüsaatoreid ja töomahukaid meetodeid. Samuti toovad Coene jt, (2018) välja, et kliinilise vajaduse nõudmisele vastamiseks tuleks kasutada metaboliitide analüüsimiseks terviklikku lähenemisviisi, mis on võimalik sihtmärgistamata metabooloomikat võimaldava kvadрупool-lennuaja kõrgresolutsiooni massispektromeetriga (*Quadrupole Time-of-Flight* - QToF). Uuringud NMR-ja LC-QTOF-iga on Wikoff jt. (2007) andmetel näidanud, et metaboliitide samaaegne sihtmärgistamata tuvastamine suurendab uute biomarkerite tuvastamise võimalust ja pakub seeläbi haiguste täpsemat kategoriseerimist ja ravi. Isegi põhjalikult uuritud haiguste puhul avastatakse jätkuvalt uusi haigusseoselisi metaboliite (Wikoff jt., 2007).

Töövoos aluseks on uuringu eesmärgi selge ja arusaadav sõnastus, millele järgi saab valida katse mudeli ja analüütilise strateegia (Tebani jt., 2016, Chetwynd jt., 2017, Rahman jt., 2023). Sellest lähtuvalt saab korraldada proovide ettevalmistamist, andmete kogumist ja statistilist analüüsi, et vähendada hälvet (*bias*) tekkimist ja saada usaldusväärsed tulemused (Tebani jt., 2016, Rahman jt., 2023). Enne proovide analüüsimist on oluline teada uuringu protsesside kulgemist, et kogutud proovi tüüp vastaks uuritavatele hüpoteesile ja meetodikale, sest erinevate kudede, rakukultuuride ja kehavedelike puhul võivad ettevalmistusprotsessid erineda (Sumner jt., 2007, Yin jt., 2013, Chetwynd jt., 2017, Alseekh jt., 2021).

Metaboliitide analüüs massispektromeetria meetodite abil annab Alseekh jt. (2021) andmetel võimaluse tuvastada ja kvantifitseerida tuhandeid metaboliite. Metaboliitide ülempiiri on keeruline määrata, sest erinevaid metaboliite on väga suurel hulgal (Alseekh jt., 2021). Kuna metabooloom on oma olemuselt väga dünaamiline, siis ühendite tuvastamine ja usaldusväärne kvantifitseerimine nõuab rangeid preanalüütilisi standardeid (Valo jt., 2022). Metaboliitide väga suur mitmekesisus tingib ka nende erineva stabiilsuse, osad analüüdid on säilitustingimuste ja -aja suhtes tundlikumad kui teised (Haid jt., 2018). Adekvaatsete vastuste tagamiseks on väga

oluline rakendada proovidele korrektseid preanalüütilisi tingimusi, sest nendele mittevastavus võib mõjutada katse edukust (Yin jt., 2013, Chetwynd jt., 2017, Alseekh jt., 2021).

## 1.5 Preanalüütika

Preanalüütilisteks protsessideks loetakse proovide kogumine, ettevalmistamine, alikvootimine, transport, säilitamine ja sulatamine (Dunn, 2011, Yin jt., 2013, Alseekh jt., 2021, Rahman jt., 2023). Preanalüütikale pööratakse järjest enam tähelepanu ja kõik need protsessid peavad olema analüüsi korrektseks õnnestumiseks standardiseeritud (Yin jt., 2013, Alseekh, 2021, Zeleznik jt., 2022, Rahman jt., 2023). Lisaks mõjutavad metaboliitide taset suuresti käitumuslikust ja elustiilist tulenevad nüansid. Neid on Zeleznik jt. (2022) andmetel palju, näiteks toitumine, füüsiline aktiivsus, naistel menopausi staatus ja sellega kaasnev ravi, lisaks vanus, kehamassiindeks.

Kõige sagedamini kasutatakse metaboliitide analüüsimiseks uriini ja verd (Dunn, 2011, Chetwynd jt., 2017). Veremetaboliitide määramiseks saab kasutada nii seerumit kui plasmata (Rahman jt., 2023). Täisverest saadakse seerum ja plasma erinevate meetoditega. Seerumi kogumiseks jäetakse Yin jt. (2013) andmetel veri hüübima ja tsentrifuugides eraldatakse settinud trombist supernatant. Protsessi käik võib esile kutsuda erinevaid ensümaatilisi reaktsioone ja sealt tulenevalt ka metaboolseid muutusi (Yin jt., 2013). Vereplasma saamiseks kasutatakse antikoagulante, mis võivad saastada proove ja mõjutada analüüsi läbi ionide supressiooni ja/või võimendamise (Yin jt., 2013). Vajalik on teada ja valida proovi tüübile sobiv ensümaatiliste reaktsioonide katkestamise meetod, et peatada kõik keemilised protsessid ja säilitada algses elusrakus esinev metaboliitide profiil (Alseekh jt., 2021). Näiteks kasutatakse Rahman jt. (2023) andmetel sihtmärgistamata metabooloomikas valkude sadestamiseks (*depletion*) tavaliselt orgaanilist lahustit, millele järgneb tsentrifuugimine või filtreerimine.

Järgnevates alapunktides on välja toodud ning selgitatud erinevate preanalüütiliste tingimuste kvaliteedi mõju metaboolsele profiilile. Lähemalt on vaadeldud erinevaid uuringuid, mis kirjeldavad preanalüütilisi tingimusi: proovimaterjali valik, verekatseti valik, paastumine, proovivõtu aeg, hemolüüsi esinemine, alikvootimine ja säilitamine.

### **1.5.1 Proovimaterjali valik**

Kuigi metaboolseid analüüse saab teostada erinevatest proovimaterjalidest, siis vastavalt uurimustöö eesmärgile keskendutakse vaid vere metaboliitide määramisele. Esmalt vaadeldakse plasma ja seerumi vahelisi erinevusi ja tutvustatakse erinevate uuringute tulemusi. Üldiselt on vere metaboliitide stabiilsuse uuringutes keskendunud pigem plasmale kui seerumile, kuid neid on ka võrreldud (Yu jt., 2011, Breier jt., 2014, Nishiumi jt., 2018, Paglia jt., 2018, Valo jt., 2022). MS meetoditel põhinevad uuringud näitasid, et mõõdetud metaboliitide kontsentratsioonid olid seerumis üldiselt kõrgemad, see võib tuleneda valkude mahuosa vähendamisest, mis muudab ülejäänud väikese molekulmassiga koostisosad kontsentreeritumaks (Yu jt., 2011, Breier jt. 2014, Nishiumi jt., 2018, Paglia jt., 2018). Võrdlusuuringus on tuvastatud seerumis kõrgema kontsentratsiooniga tulemused aminohapete ja biogeensete amiinide puhul, võrreldes plasmaga (Paglia jt. 2018) Eraldi tuuakse välja ka veel asparagiinhappe, tauriini ja serotoniini kontsentratsiooni tõus seerumi puhul (Paglia jt., 2018). Lisaks on leitud seerumis arginiini kõrgemat kontsentratsiooni, mille põhjuseks võib olla selle vabanemine trombotsüütidest hüübimisprotsessi ajal (Yu jt., 2011). Sarnane analüüt on Yang jt. (2013) andmetel ka serotoniin, mis paikneb vereliistakutes ja mis võib neist vabanedes anda kõrgenenud väärtusi ka plasmas.

Kahes läbiviidud uuringus hinnati plasma usaldusväärsust kõrgemalt ning tõdeti, et plasma tagab reprodutseeritavamad metaboolsed profiilid (Yu jt., 2011, Breier jt., 2014). Yu jt. (2011) leidsid, et plasma parem reprodutseeritavus võib tuleneda asjaolust, et plasma kogumisel ei kulu aega hüübimisele ja seetõttu on protsess lihtsam ning kiirem. Seerumi hüübimisprotsessi käigus vabaneb erinevas koguses vererakkudest pärinevaid metaboliite, mis võivad mõjutada metaboliitide kontsentratsioone rohkem kui plasma ettevalmistus (Nishiumi jt., 2018). Kokkuvõttes võib järeldada, et metaboolse profiili uuringutes on eelis pigem plasmal.

### **1.5.2 Verekatsuti valik**

Vere kogumisel võib kasutada erinevaid proovinõusid, millel võib olla mõju analüüsitulemustele. Järgnevalt on kirjeldatud erinevaid uuringuid, kus teostati võrdluskatseid koagulandi mõju hindamiseks. Uuringutes, kus võrreldi NMR meetodil hepariini ja EDTA lisandite mõju üldisele metaboolsele profiilile, erinevusi ei täheldatud (Pinto jt., 2014, Townsend jt., 2013, Midttun jt., 2014). Townsend jt (2013) võrdlesid 158 metaboliidi tulemusi, millest 92% olid sarnase

varieeruvusega, sarnased tulemused leidsid ka Midttun jt. (2014), võrreldes 38 metaboliidi stabiilsust. Yin jt. (2013) on näidanud, et LC-MS meetodil võrreldud EDTA, tsitraadi, naatriumfluoriidi, liitiumhepariini katsutisse võetud tühiproovides ja plasma metaboolsetes profiilides esines kõige vähem katsutist tulenevat müra EDTA ning naatriumfluoriidi puhul, kuid tsitraadi lisandiga katsuti tühiproov näitas vaid mõningaid lisasignaale. Yin jt. (2013) järeldasid, et keemiline müra võib pärineda katsutites olevatest plasthelistest ning leidsid, et kõige usaldusväärsemad tulemused saadakse EDTA katsuteid kasutades. Lisaks eelnimetatud plasma katsutitele analüüstiti ka seerumi proovinõud ning selle müra hulk oli sarnane liitiumhepariini proovinõule (Yin jt., 2013).

Uuringus, kus 80 inimeselt koguti veri EDTA, tsitraadi ja seerumi vereksutisse, leiti EDTA katsutist sarkosiini sisaldus, seega ei sobi EDTA plasma sarkosiini täpseks mõõtmiseks (Paglia jt., 2018). Hepariini, EDTA ja tsitraadi lisandite mõju võrdlusuuringus metaboolsele profiilile pidasid Hebels jt. (2013) parimaks valikuks hepariini sisaldusega verevõtu katsutit, sest selle proovinõu korral oli tõenäosus ioonsupressiooni tekkeks minimaalseim. Samuti leidsid Hebels jt. (2013), et erinevate verevõtu katsutitesse võetud plasmaproovide analüüsitulemusi ei tohiks omavahel võrrelda (Hebels jt., 2013). Kuid siiski on leitud, et suurimad metabooli erinevused tulenevad pigem seerumi ja plasma erinevustest, kui plasma erinevate vereksutite lisanditest (Paglia jt., 2018). Nende uuringutega tutvumise järel ei saa väita, et kindla lisandiga katsutil on teiste ees selge eelis. Soovituslikult peaksid proovivõtu tarvikud pärinema samalt tootjalt, sest need mõjutavad proovi ja tulemused kajastuvad analüüsivastuses (Sumner jt., 2007).

### **1.5.3. Paastumine**

Üheks preanalüütiliseks tingimuseks, mis võib mõjutada metaboolset profiili, peetakse ka paastumist. Uuringus, kus Townsend jt. (2013) võrdlesid rohkem kui kaheksa tundi paastunud ja mitte paastunud patsientide vereplasmasid, jäi erinevate metaboliitide klasside piikide pindalade erinevus <6%. Üldiselt leiti, et paastumine ei mõjuta enamiku metaboliitide laboratoorset varieeruvust (Townsend jt., 2013). Hilisemas uuringus vaadeldi erinevate paastumisaegade mõju metaboolse profiili tulemustele ja Townsend jt. (2016) tõid välja erinevate aineklasside varieeruvuse. Uuringus selgus, et aminohapete tase vereproovis oli langenud alles pärast >5–13 tunnist paastu, selle põhjal peaks nende täpsel mõõtmisel kaaluma pikemat paastu (Townsend jt., 2016). Kuid enamiku (>80%) aminohapete piikide pindalade protsentuaalsed erinevused olid

<15% ja seega järeldasid Townsend jt. (2016), et paastumine ei mõjuta oluliselt aminohapete mõõtetulemusi. Uuringus osutusid aga sapphapped ja vitamiinid kõige varieeruvamateks metaboliitideks, mille muutlikkus oli suur <4 tunnise paastu järel, see tuleneb toitainete tarbimisest ja keha füsioloogiliste protsesside eripäradest (Townsend jt., 2016). Lisaks lugesid Townsend jt. (2016) varieeruvateks ka orgaanilised happed ning puriinid ja pürimidiinid, mille tasemete puhul leiti kerge erinevus ka <4 tunnise paastu järel. Kuigi uuringus on toodud välja erinevate aineklasside varieeruvused, siis kokkuvõtlikult järeldatakse, et paastumise on preanalüütilise tingimusena metaboolsete uuringute tulemuste suhtes vähe oluline (Townsend jt., 2016).

Paastumise mõju uuringuid on tehtud ka vereseerumitega, kus leiti paastumise mõju aminohapetele ja atsüülkarnitiinidele (Thomson jt., 2012). On leitud, et paastumise mõjul keha muudab enda glükogeeni varud rasvhapeteks, mistõttu atsüülkarnitiinide tase organismis tõuseb, samas kui mittepaastumine suurendab aminohapete ning vähendab atsüülkarnitiinide kontsentratsiooni (Thomson jt., 2012). Paastumise mõju atsüülkarnitiinidele on leidnud ka Carayol jt. (2015). On näidatud, et paastuseerumi tulemused on erinevates ajapunktides mõõdetuna reprodutseeritavad, kui mitte paastumise korral (Carayol jt., 2015). Kokkuvõtvalt ei ole leitud paastumise/mittepaastumise suurt mõju enamikule metaboliitidele, seega ei peeta metaboolsete uuringute puhul seda preanalüütilist tingimust niivõrd oluliseks mõjutajaks. Kuid kui lähtuda Townsend jt. (2016) uuringu tulemusest, siis soovitavalt tuleks paastumine preanalüütilise tegurina fikseerida, et sellega tulemuste võrdluses vajadusel arvestada.

Metaboliitide kontsentratsioonide stabiilsust seoses paastumisega on uuritud ka indiviidi tasemel. Paastunud doonoritelt kahe nädalase perioodi jooksul kolmel korral kogutud vereproovides säilisid kõikide analüüsitud metaboliitide kontsentratsioonid stabiilsetena (Breier jt., 2014). Paastunud naistelt 10 aastase vahega kogutud proovide analüüsimisel hinnati metaboliidid stabiilseteks, kuid muutusi oli rohkem võrreldes lühema perioodiga (Zeleznik jt., 2014). Nii pika aja jooksul muutuvad inimese käitumuslikud ja elustiililised tegurid, mis omavad teatavat mõju metaboliitidele (Zeleznik jt., 2014). Uuringus järeldati, et metaboliitide üldine stabiilsena püsimine annab olulist informatsiooni, et seostada suuremaid kõrvalekaldeid haiguste riskidega (Zeleznik jt., 2014). Kokkuvõtlikult saab järeldada, et paastumisel võib olla indiviidisese metaboolse stabiilsuse jälgimisel oluline osa (Breier jt., 2014, Zeleznik jt., 2022).

### **1.5.4 Proovivõtu aeg**

Kuna metaboolloom on tundlik erinevatele teguritele, on plasmaproovide kogumise puhul uuritud ka metaboliitide tasemete kõikumisi vastavalt kellaajale ja aastaajale (Ang jt., 2012, Townsend jt., 2016). Uuringus, kus plasma koguti kaheksalt rangetele eeltingimustele vastavalt patsiendilt, leiti 19% 1069-st metaboliidi tunnusest igapäevane bioloogiline varieeruvus (Ang jt., 2012). Muutust märgati Ang jt. (2012) andmetel metaboliitidel nagu kortikosteroidid, bilirubiin, atsüülkarnitiinid ja fosfolipiidid ja mõned aminohapped. Oluline ööpäevane kõikumine leiti aminohapetel: lüsiin, proliin, leutsiin, metioniin, fenüülalaniin ja türosiin (Ang jt., 2012). Olulist muutumist ei täheldatud Ang jt. (2012) järgialaniini, arginiini, trüptofaani ja valiini korral. Uuringus, kus enne analüüsi võtmist paastuti rohkem kui kaheksa tundi, eelnevalt mainitud kuue muutliku aminohappe ööpäevast kõikumist ei leitud (Townsend jt., 2016). Uuringus, kus keskenduti aastaegadest tingitud metaboolse profiili mõjudele, leiti et päikesevalguse intensiivsus ja olemasolu võib mõjutada sapphapete, orgaaniliste hapete ning puriinide ja pürimidiinide tulemusi (Townsend jt. 2016). Uuringus järelitati, et leiud viitavad erineva kellaaja või aastaaja mõjudele ainult konkreetsete metaboliitide puhul, mis suures plaanis ei põhjusta olulisi tulemuste varieeruvust (Townsend jt., 2016).

### **1.5.5 Hemolüüs**

Üheks preanalüütiliseks muutujaks, mis võib mõõdetulemusi mõjutada, peetakse hemolüüsi (Yin jt., 2013, Kamlage jt., 2014). Uuringud, mis viidi läbi MS meetodil, kasutati plasma esilekutsutud hemolüüsi hindamisel kaheastmelist skaalat, hinnates mõõdukaks või raskeks (Yin jt., 2013, Kamlage jt., 2014). Mõlema raskusastme korral täheldasid Yin jt. (2013) vaba hemoglobiini, aspartaat transferaasi ja kaaliumi olulist suurenemist. Teises uuringus leidis Kamlage jt. (2014), et hemolüüsi raskusastme suurenedes kasvas mõjutatud metaboliitide arv, olles mõõduka puhul 18% ja raske korral 30%. Mõlemas uuringud järelitati, et hemolüüs mõjutas oluliselt väga paljusid metaboolseid tunnuseid ja seetõttu on sellel negatiivne mõju metaboolsele uuringule (Yin jt., 2013, Kamlage jt., 2014). Nende uuringute põhjal võib järelitada, et hemolüüsil on metaboolsele profiilile oluline mõju ja selle vältimine preanalüütilise tingimusena on väga oluline.

## 1.5.6 Tsentrifuugimine

Proovide tsentrifuugimise eelsel ajal on oluline üksteisest sõltuvad temperatuur ja aeg. Sihtmärgistamata MS meetodil on läbi viidud uuringud, kus kasutati üht kuni nelja ajapunkti ja kahte erinevat temperatuuri: toatemperatuuri 18-25 °C ja jahedat, 0 kuni 4 °C (Yin jt., 2013, Nishiumi jt., 2018) ning Kamlage jt. (2013) kasutasid enda uuringus lisaks veel kolmandat temperatuuri punkti, lisades eelnevatele 12 °C tingimused. Yin jt. (2013) leidsid, et metaboliitide tasemed ja profiilid muutusid kiiremini, kui tsentrifuugimise eelsel ajal hoiustati proove toatemperatuuril. Puriini derivaadi, hüpoksantiini taseme tõus oli märkimisväärne pärast 4 tundi toatemperatuuril hoidmist (Yin jt., 2013). Samas kui vereproovid asetati enne plasma eraldamist jäävette, olid muutused hüpoksantiini ja teiste metaboliitide tasemetes Yin jt. (2013) tulemustel ebaolulised. Nishiumi jt. (2018) leidsid, et hüpoksantiini tase tõusis hoolimata erinevatel temperatuuridel säilitamisest, sest erütrotsüütidest ja trombotsüütidest vabanenud hüpoksantiin oli mõjutanud plasma tulemusi enne tsentrifuugimist. Hüpoksantiini saab laboris kasutada preanalüütilise markerina, et tuvastada tsentrifuugimisel tehtavad süstemaatilised vead (Yin jt., 2013).

Lühim uuritud tsentrifuugimise eelne viivitus toatemperatuuril oli 15 min ja juba sellise viivituse korral mõned metaboliidid muutusid, nt tõusis püroviinhape ja sahharoosi tase, samas kui 4 °C säilitustingimuses hoituna sahharoos ei muutunud, aga püroviinhappe tase langes (Nishiumi jt., 2018). Pärast 30 min möödumist olid muutused täheldatavad juba rohkemates metaboliitides (Kamlage jt., 2014, Nishiumi jt., 2018). Serotoniini, tauriini kontsentratsioonidele mõjus tsentrifuugimiseelne viivitus, kuid ei mõjunud plasma säilitamine toatemperatuuril (Kamlage jt., 2014). Uuringus, kus võrreldi proovivõtmise nullpunktil ja 24-tunnise viivituse järel töödeldud proove, leiti süsivesikute, puriinide, pürimidiinide ja derivaatide metaboliitide kompleks, mille tulemusi ei saa viivitusega proovides adekvaatselt hinnata (Townsend jt., 2013). Kokkuvõtvalt saab järeldada, et rohkem kui 15 minutit tsentrifuugimise eelset viivitust võib märkimisväärselt mõjutada plasma metaboliitide profiili analüüsi, seega on kvaliteedi tagamiseks vajalik sellist preanalüütilist viivitust vältida või dokumenteerida (Yin jt., 2013, Nishiumi jt., 2018). Viivituse korral tuleb arvestada, et kõige olulisemad metaboolsed muutused toimuvad energiaga seotud metaboliitides (nt glükoos, püruvaat, laktaat) (Kamlage jt., 2013). Kui erandolukorras ei ole võimalik koheselt proove tsentrifuugida, siis peaks proovid asetama jäävette, kuid mitte kauemaks kui paariks tunniks (Yin jt., 2013, Kamlage jt., 2014).

Uuringus, kus vaadeldi tsentrifuugimistingimuste mõju metaboliidi profiilile plasmas ja seerumis, teostati mõõtmised MS meetodil (Ammerlaan jt., 2014). Tsentrifuugimistingimuste juures arvestati tsentrifugaaljõudu, temperatuuri, aega ja pidurdusjõudu ja leiti, et nende varieeruvus uuritud ulatuses ei mõjuta oluliselt metaboolseid profiile (Ammerlaan jt., 2014). Samuti ei täheldatud olulisi varieeruvusi spetsiifiliste metaboliitide tasemetes temperatuuride 4 °C ja 20 °C võrdluses (Ammerlaan jt., 2014). Plasma puhul leiti, et eelistada tuleks toatemperatuuril tsentrifuugimist, mis annab vähem mikroosakesi ja väiksema tõenäosuse hemolüüsiks ning optimaalseks peeti ühte 20 minutilist tsentrifuugimist 2000 g juures (Ammerlaan jt., 2014). Kõige olulisem on metaboolsete uuringute läbiviimisel tsentrifuugimistingimused standardiseerida, kasutades tootjapoolseid soovitusi (Sumner jt., 2007).

### **1.5.7 Alikvootimine**

Erinevad uuringud soovitavad proovide kogumise järgselt need koheselt alikvootida ja külmutada soovitavalt –80 °C juures, et säiliks metaboolne reprodutseeritavus (Breier jt., 2014, Pinto jt., 2014, Zhang jt., 2015, Nishiimi jt., 2017, Haid jt., 2018). On leitud, et alikvootide arv tuleb valida sõltuvalt uuringu mahust ja eesmärkidest ning soovitavalt ei tohiks neile rohkem kui kolm korda sulatamise ja külmutamise protsessi teostada (Breier jt., 2014, Zhang jt., 2015). Pärast üht sulatustsüklit leidis Breier jt. (2014) muutuse ainult metioniin sulfoksiidi kontsentratsioonis ja pärast kaht sulatustsüklit 159st testitud metaboliidist 11 puhul, sh kolmel aminohappel: isoleutsiin, trüptofaan ja valiin. Alates kahes sulatustsüklist leidsid Yin jt. (2013) L-karnitiini vähenemist 70% võrra. Samas rohkem kui kolme tsükli kordamine tekitas muutusi lipiidide, koliini sisaldavate ühendite, aminohapete ja energiaga seotud metaboliitide tasemetes (Pinto jt., 2014). Lisaks mõjutab temperatuuri kõikumine valkude stabiilsust ning seega on labori töövoos soovitatav külmutus- ja sulatusprotsessid dokumenteerida (Ammerlaan jt., 2014). Zhang jt. (2015) tõid olulise nüansina välja kemikaalidega seotud süsteemsete kõrvalekallete minimeerimise, kasutades alikvootimiseks alati sama tootja proovinõudest pärinevat materjali.

Proovide transpordi eelselt tuleks alikvootide külmutamine teostada kogumiskohas ning seejärel vältida uuesti üles sulatamist (Pinto jt., 2014, Breier jt., 2014). On näidatud, et kui kogumiskohas ei ole võimalik proove –80 °C juures säilitada, võib plasma alikvooti hoida –20 °C juures kuni üks nädal ning 4 °C juures kuni kaks tundi (Pinto jt., 2014). Ajutise säilitamise järel on kindlasti vaja proovid viia –80 °C juurde kuni analüüside teostamiseni (Pinto jt., 2014).

### 1.5.8 Plasma säilitamine

Plasma metabooloom on tundlik säilitustemperatuuri ja -aja suhtes (Moriya jt., 2016, Yang jt., 2013). Enamik plasma metaboliite on pärast tsentrifugimist stabiilsed temperatuuril  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Moriya jt., 2016, Yang jt., 2013). Kui säilitustingimused ei ole korrektsed, hakkab metaboliitide profiil ajas muutuma (Yin jt., 2013, Kamlage jt., 2014, Pinto jt., 2014, Moriya jt., 2016). Järgnevalt on lähemalt tutvustatud erinevaid metaboliitide stabiilsuse uuringuid. On vaadeldud plasma aminohapete kontsentratsioonide muutumist ajas ning leitud mitmeid muutujaid (Kamlage jt., 2014). Plasmaproove säilitati kolmel erineval temperatuuril ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ja toatemperatuur  $18\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ning mõõdeti lisaks nullpunktile ka erinevates ajapunktides (30 min, 2h, 5h, 16 h) (Kamlage jt., 2014). Täheledatai glutamaadi kontsentratsiooni tõus nii  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  säilitustingimustes kui ka toatemperatuuril 16 tunni järel, olles viimase puhul viie kordne (Kamlage jt., 2014). Samas kui tsüsteiini kontsentratsioon vähenes toatemperatuuril säilitades Kamlage jt. (2014) hinnangul 16 tunni järel umbes poole võrra. Tsüsteiin on Moriya jt. (2016) põhjal aminohapetest kõige muutlikum ja taseme vähenemise põhjuseks peetakse tema kiiret oksüdeerumist tsüstiiniks. Lisaks tsüsteiinile on muutlikud ka asparagiin ja glutamiin, muutudes enda dikarbosküülhappe analoogideks: aspartaadiks ja glutamaadiks (Kamlage jt., 2014). Glutamiini kontsentratsiooni langus oli toatemperatuuril 16 tundi säilitatud plasmas 60% (Kamlage jt. 2014). Selliseid ebastabiilseid markereid soovitatakse kasutada plasma kvaliteedimarkeritena (Pinto jt., 2014).

Kamlage jt. (2014) tõid välja, et aminohapetest ei esinenud toatemperatuuril 16 tundi säilitatud plasmas olulist muutust metioniini, proliini, serotoniini, trüptofaani, tauriini, leutsiini ja ketoleutsiini kontsentratsioonides. Metioniini stabiilsust kinnitasid uuringus ka Moriya jt. (2016). Samas kui Pinto jt. (2014), leidsid täheldasid ühe kuu möödumisel proliini kontsentratsioon 25% tõusu. Kuid tsentrifugimiseelne viivitus mõjutas neist kõiki peale metioniini (Kamlage jt., 2014). Alaniini kontsentratsioon täheldati toatemperatuuril minimaalset tõusu, samas kui valiini kontsentratsioon  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  säilitustingimustel langes, mõlema analüüdi CV oli 5% (Kamlage jt., 2014). Üldiselt peetakse aminohapetele iseloomulikuks tasemete langust, sarnaselt süsivesikutele (Moriya jt., 2016). Kuid Kamlage jt. (2014) leidsid, maltoosi kontsentratsiooni suurenemise kõikidel analüüsitud temperatuuridel ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $18\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), samas kui glükoosi kontsentratsioon samadel tingimustel vähenes. Maltoosi kontsentratsioon  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  säilitustingimustel kasvas 16 tunni möödumisel 2,6 korda (Kamlage jt., 2014).

Lisaks leidsid Kamlage jt. (2014), et plasma säilitamine kõrgemal kui  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mõjutab tugevalt ka lipiidide metaboolset reprodutseeritavust. Vabadele pikaajalistele rasvhapetele on iseloomulik kontsentratsiooni suurenemine nii toatemperatuuril kui  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures, põhjuseks ensümaatilised reaktsioonid (Moriya jt., 2016). Lisaks ensümaatilistele reaktsioonidele võivad metaboliitides Haid jt. (2018) järgi muutusi põhjustada ka oksüdatsioonireaktsioonid ning happeline või aluseline hüdroolüüs. Kontsentratsioonide vähenemist on leitud lühikese ahelaga rasvhapete puhul (Moriya jt., 2016). On uuritud ka nukleosiidide kontsentratsioonide muutusi ja leitud 6-metüüladenosiini kontsentratsiooni tõusu toatemperatuuril kuni kuue tunni ja  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  säilitustingimustes ühe nädala möödumisel, põhjuseks metüültransferaasi aktiivsuse tõusus, mis viitab mRNA lagundamisele RNAaside poolt (Moriya jt., 2016). Samas kui nukleosiid 1-metüüladenosiini kontsentratsioon püsis Moriya jt. (2016) andmetel ööpäeva jooksul stabiilne.

Sarnaselt teostatud uuringus leidsid Breier jt. (2014) 24 tundi toatemperatuuril inkubeeritud plasmas heksooside tasemete langused. Leitud on, et säilitustemperatuurid võivad mõjutada konkreetsete valkude stabiilsust, märkimisväärset valgukadu täheldati säilitustingimustel: toatemperatuuril üle 4 tunni ja temperatuuril  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  24 tundi (Ammerlaan jt., 2014). Valkude lagunemist on leitud ka seerumi säilitamisel  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures ehk temperatuur ei olnud piisav ensümaatilise aktiivsuse peatamiseks (Valo jt., 2022).

Proovide säilitamisel  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  säilitustingimustel ühe nädala vältel muutusi ei leitud, erinevalt kuu pikkusest perioodist, kus tasemed muutusid umbes 10%-l metaboliitidest (Moriya jt., 2016). Samas kui nädal aega  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures säilitatud proovides esines muutusi umbes kolmandikus metaboliitide kontsentratsioonides (Moriya jt., 2016). Näiteks jäi madalamal temperatuuril 5-oksopropiini kontsentratsioon stabiilseks, kuid tõusis  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  säilitustingimustes juba 24 h möödumisel (Moriya jt., 2016). Uuringus järelitati, et lühemate viivituste ja madalama säilitustemperatuuri korral on võimalik minimeerida ensümaatilisi reaktsioone ning tagada hea reprodutseeritavus ja metaboolsete andmete järjepidevus (Moriya jt., 2016).

On läbi viidud uuring, kus plasmasid säilitati ja analüüsiti pikema perioodi jooksul. Kasutati EDTA katsutitesse kogutud plasmaproove, säilitades neid  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures kuni 16 aastat ja leiti olulised muutused kontsentratsioonides seitsme aasta möödudes (Wagner-Golbs jt., 2019). Kõige enam leiti mõjutused aminohapete, lipiidide, rasvhapete ja energiaga seotud metaboliitide kontsentratsioonides (Wagner-Golbs jt., 2019). Sarnaselt eelpoolkirjeldatud uuringutele täheldati

aspartaadi kontsentratsiooni suurenemine ajas, mis viitab taaskord asparagiini muutumisele aspartaadiks (Wagner-Golbs jt., 2019). Sarnaselt täheldati ka tsüsteiini oksüdeerumist tsüstiiniks (Wagner-Golbs jt., 2019). Leiti, et kõige parema metaboolse profiili reprodutseeritavuse tagab plasmade säilitamine  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures (Wagner-Golbs jt., 2019). Ka Pinto jt. (2014) hinnangul plasma säilitamine  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures tagab proovi metaboolse reprodutseeritavuse kuni viis aastat. Autorid järeldasid, et pikaajalisel plasma säilitamisel  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures on küll vähene mõju metaboliitide kontsentratsioonidele, kuid analüüsid tuleks pärast proovide võtmist võimalikult kiiresti teostada (Haid jt., 2018, Wagner-Golbs jt., 2019).

Uuritud on ka koondplasma (*pooled plasma sample*) ehk valitud arvu erinevate indiviidide liidetud proovide metaboliitide kontsentratsioonide pikaajalist säilimist  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures (Haid jt., 2018). Kokku analüüsiti koondplasma proovis 111 metaboliiti ja umbes poole kontsentratsioonides leiti viie aasta jooksul statistiliselt olulised muutused, sh. aminohapped ja heksoosid, kuid keskmine muutus jäi  $<15\%$  (Haid jt., 2018). Pika perioodi jooksul muutuvad erinevate metaboliidi klasside kontsentratsioonid erinevalt, nt aminohapete tase on stabiilne või tõusnud, keskmiselt  $15,4\%$ , mis võib tuleneda peptiidide ja valkude lagunemisest (Haid jt., 2018). Kontsentratsiooni tõusu täheldati arginiini, glütsiini ja seriini puhul (Haid jt., 2018). Atsüülkarnitiinide ja fosfatidüülkoliinide kontsentratsioonid olid stabiilsed või vähenenud, keskmiselt  $12,1\%$  ja  $15,1\%$  (Haid jt., 2018). Atsüülkarnitiinide puhul võib põhjuseks olla karnitiini ja rasvahapete vaheliste estersidemete hüdroolüüs ning koliinide puhul pearühma vastuvõtlikkus hüdroolüüsile (Haid jt., 2018).

Eelpoolkirjeldatud uuringute põhjal saab järeldada, et metaboolika uuringutes reprodutseeritavate ja usaldusväärsete tulemuste saamiseks on vajalik kvaliteedikontrollide rakendamine, preanalüütiliste tingimuste standardiseerimine ja fikseerimine, et analüüsimisel erinevaid preanalüütilisi tingimusi arvesse võtta (Kamlage jt., 2014, Valo jt., 2022). Analüütiliste protsesside ühtsed kvaliteedikontrolli protsessid tagavad metaboolsete andmete järjepidevuse (Moriya jt., 2016).

Ülalkirjeldatud uuringutes on vaadeldud väga erinevaid temperatuure, kuid valitud ajaperioodid on kliinilise töövoos seisukohast liiga lühikesed või pikad. Lühemate ajaperioodide uuringutes on keskendunud metaboliitide kontsentratsioonide muutustele pigem tundide kui päevade või nädalate kaupa (Pinto jt., 2014, Kamlage jt., 2014, Moriya jt. 2016). Pinto jt., (2014) teostasid

lisaks paastumise ja vere transporditingimuste uuringule põgusa ülevaate ka EDTA katsutitesse kogutud plasma säilitamist  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures kuni ühe kuu. Järeldati, et plasma alikvoote võib säilitada  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures kuni üks nädal ning  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures kuni kaks tundi (Pinto jt., 2014). Teostatud on ka pikaajalisemad uuringud, kus metaboliitide stabiilsusi on hinnatud mitme aasta möödumisel (Haid jt., 2018, Wagner-Golbs jt., 2019). Metaboliitide stabiilsusuuringuid on läbi viidud üsna vähe ja enamasti on tulemustes avaldatud ainult üksikute analüütide detailsed muutused, pigem on tehtud üldistusi aineklasside kaupa. See on tingitud olukorra, kus metaboliitide kontsentratsioonide stabiilsusi peaks kliinilise töövoos tingimustes jälgima.

## **2. EKSPERIMENTAALOSA**

### **2.1 Töö eesmärgid**

Magistritöö üldiseks eesmärgiks oli välja selgitada metaboolseks analüüsiks sobivad vereplasma säilitustingimused. Pinto jt. (2014) andmetel tagab plasma säilitamine  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures metaboolse profiili reprodutseeritavuse, kuid kõrgematel temperatuuridel säilitamine tingib mõnede analüütide kontsentratsioonide muutumise (Kamlage jt. 2014). Kliinilises töös võib tekkida olukordi, kus plasma kohene külmutamine  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures ei ole aparatuuri olemasolu tõttu võimalik. Säilitustingimuste väljaselgitamiseks hinnati eksperimendis 10 doonori plasma metaboliitide sisaldust erinevates ajapunktides pärast proovi võtmist (0 päeva, 7 päeva, 28 päeva, 56 päeva), säilitades vereplasmasid kolmel erineval temperatuuril ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Selle saavutamiseks püstitati alaeesmärgid:

1. Hinnata, kas proovide säilitamine lühemat aega kõrgemal kui  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  mõjutab analüüsitulemusi. Kontrollides hüpoteesi, et erinevatel temperatuuridel säilitatud plasmade analüütide kontsentratsioonides metaboolse profiili mõõtmisel erinevusi ei esine.
2. Võrrelda magistritöös erinevatel temperatuuridel ja ajapunktides saadud tulemusi kirjanduses avaldatud andmetega.

Magistritöö on oluliseks aluseks metabooloomika meetodite arendusel SA TÜK Geneetika ja personaalmeditsiini kliinikus.

### **2.2 Materjalid ja meetoodika**

#### **2.2.1 Proovide kogumine ja ettevalmistamine**

Kuna magistritöö eksperimendis kasutati inimverd, siis taodeldi Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee kooskõlastus (Protokolli number: 384/T-11), mis väljastati uuringule novembris 2023. Seejärel koguti proovid hea üldise enesetundega 20–65 aastastelt doonoritelt, kes olid valitud juhuslikult ning nende terviseandmeid arvesse ei võetud. Enne vereproovi kogumist allkirjastasid doonorid vastava nõusolekuvormi, kinnitamaks oma proovide kasutamise metabooloomi stabiilsusuuringus. Uuritavatelt koguti vereanalüüsid tavapärase veenivere

punktsiooni käigus. Uuringu jaoks koguti kaks EDTA (etüleendiamiintetraatsetaadiga) katsutit ehk 2x3 ml verd. Veeni punktsiooni teostas SA TÜK Geneetika ja personaalmeditsiini kliiniku meditsiini õde, kõik järgnevad etapid teostas uurimustöö teostaja. Proovid koguti spetsiaalselt selle uurimistöö jaoks, veenipunktsiooni ei ühildatud teiste diagnostiliste analüüside kogumisega. Uuringu jaoks fikseeriti proovide kogumise täpne aeg, et anonüümseid proove üksteisest eristada. Doonoritelt ei nõutud eelnevat paastumist ega protokollitud vastavalt. Verekatsutid tsentrifugeeriti koheselt toatemperatuuril, 2000 × g juures 10 minutit ja eraldati seejärel plasma, mis alikvooditi märgistatud 1,5 ml mikrotsentrifugeeritubidesse. Proovid säilitati enne analüüsimist digitaalse häirega külmikutes, vastavalt uuringus toodud kolmel erineval temperatuuril (4 °C, -20 °C, -80 °C).

## 2.2.2 Meetodi optimeerimine

Plasmaproove analüüsiti Agilent 1290 ülikõrge jõudlusega LC-süsteemil, mis oli ühendatud massispektromeetriga Agilent 6546 QTOF (*Quadrupole Time-of-Flight*) (Agilent Technologies, Inc., USA). Viimane on varustatud kahekordse elektropihustusionisatsiooni (*Agilent Jet Stream ESI*) allikaga. Tegemist on esmakordsete mõõtmistega, meetod on arendusfaasis, mistõttu teostati meetodi optimeerimiseks vajalikud protseduurid, lähtudes peamiselt Coene jt. (2018) avaldatud artiklist. Proove mõõdeti nii positiivses kui ka negatiivses ionisatsioonirežiimis. Ettevalmistatud plasmaproovi alikvoot süstiti 40 °C juurde termostateeritud kolonni (*Waters ACQUITY Premier HSS T3 with VanGuard FIT, 1.8 μm, 2.1 x 100 mm*). Kromatograafilised eraldamised teostati binaarse mobiilse faasi abil. Positiivse ESI režiimis tehtud analüüside puhul koosnes mobiilfaas A veest, mis sisaldas 0,1% sipelghapet ja mobiilfaas B oli vesi/metanool (1:99), mis sisaldas 0,1% sipelghapet. Negatiivses ESI režiimis tehtud analüüside puhul koosnes mobiilfaas A veest, mis sisaldas 10 mmol/l äädikhapet, ja liikuv faas 2 oli vesi/metanool (1:99 maht/maht), mis sisaldas 10 mmol/l äädikhapet. Voolukiirus oli 0,4 ml/min;

Meetodite optimeerimiseks korraldati võrdluskatse, kus QTOF massispektromeetril loodi nii positiivsete kui negatiivsete ionide režiimis kahed erinevad parameetrid vastavalt kirjanduses kasutatud andmetele ja tootjapoolsetele soovitudele. Esimeste parameetritena kasutati võrdluskatsetel mõlemas ionirežiimis nebulisaatori gaasi rõhuga 45 psi, kuivatusgaasi temperatuuriga 225 °C ja voolukiirusega 8 l/min. Kapillaarpinge oli negatiivse režiimi puhul 4500 V ja positiivse puhul 3500 V. Võrdluseks loodi erinevate parameetritega režiimid, kus need

omadused olid negatiivsel 3000 V, 45 psi, 325 °C ja 10 l/min. Positiivses režiimis kapillaarpingega 3500 V, nebulisaatori gaasi rõhuga 45 psi, kuivatusgaasi temperatuuriga 275 °C ja voolukiirusega 10 l/min. Massispektri andmed koguti profiilirežiimis, kasutades skaneerimisvahemikku 60–1700 m/z. Eelpool kirjeldatud võrdluskatsetes teostati mõõtmised kiirustel 1, 2 ja 3 skaneeringut sekundis, vastavalt oli skanneerimisaeg 1s, 0,5 s ja 0,33 s. Lähtetingimus 3 skaneeringut sekundis oli valitud Coene jt. (2018) avaldatud artikli alusel, kuid sooviti hinnata, kas sagedust saaks vähendada. Sellest tulenevalt teostati mõlemas režiimis kuus mõõtmist ning võrreldi tulemusi. Oluliseks peeti leitud kromatograafiliste signaalide hulka, nende intensiivsust ning mõõtepunktide hulka kromatograafilises piigis. Mida väiksem skanneerimisaeg, seda enam on andmepunkte kromatograafilises piigis, kuid selle arvelt väheneb signaalide intensiivsus ning üheskoos sellega ka tundlikkus ning kromatograafiliste signaalide koguhulk. Mõlema režiimi puhul otsustati valida mõõte kiiruseks 2 skaneeringut sekundis, mis andis piisava arvu andmepunkte (vähemalt 10) kõikide uuritud kromatograafiliste piikide jaoks. Positiivsel režiimil jäädigi esmaste parameetrite juurde. Negatiivse režiimi puhul osutusid mõõtmistulemused paremaks teisea loodud parameetrite korral.

Labori töövöö hõlbustamiseks loodi metaboliitide raamatukogu, milleks kasutati seitsmest mikroitiiterplaadist koosnevat komplekti (*MSMLS-1EA, 230-16, Sigma-Aldrich, USA*), mis sisaldavad üle 600 erineva kõrge puhtusastmega biokeemilist molekuli. Sellise suurusega metaboliitide raamatukogu sisaldab erinevaid ühendite klasse (karboksüülhapped, aminohapped, biogeensed amiinid, polüamiinid, nukleotiidid, koensüümid ja vitamiinid, samuti mono- ja disahhariidid ning rasvhapped, lipiidid, steroidid ja hormoonid), hõlmates esmaseid metaboliite ja nende vahesaadusi, millega peaks olema kaetud peamised metaboolsed rajad. Raamatukogu loomisega tekitati usaldusväärne meetod proovides leiduvate metaboliitide identifitseerimiseks (Sumner jt., 2007). Standardiseeritud metaboliitide plaadid valmistati ette vastavalt juhendile (Iroa Technologies v20231214) ja süstiti nii positiivses kui negatiivses ioonirežiimis, eelnevalt optimeeritud meetoditel, 2 skaneeringut sekundis. Ühtlasi mõõdeti ka metaboliitide fragmentatsioonispektrid Auto MS/MS režiimis kasutades kolme erinevat kollisioonienergiat (10 V, 20 V ja 40 V). Mõõtetulemuste põhjal sai tootjapoolset eriprogrammi (MSMLSDiscovery) kasutades koostada digitaalse metaboliitide raamatukogu koos ühenditele vastavate identifikaatorite, retentsiooniaegade ning massi- ja fragmentatsioonispektritega, mida kasutati hiljem metaboliitide identifitseerimiseks proovimaterjalides.

### 2.2.3 Analüüsi teostamine

Analüüsi teostamiseks kasutati kümneelt erinevalt doonorilt kogutud plasmat, mis valmistati ette vahetult enne vastavat ajapunkti pärast proovide võtmist, eelpoolkirjeldatud meetodil. Proovid jagunesid 50% mees- ja 50% naisdoonorite plasmadeks, mis olid kogutud 20-65 aastastelt hea üldise enesetundega vabatahtlikelt. Lisaks ettevalmistatud üksikutele plasmaproovidele sisaldas iga analüütiline partii ka doonoriplasmadele sarnaselt ettevalmistatud tühiproovi (*blank*). Samuti valmistati sarnaselt doonori proovidele ette koondplasma (*pooled plasma sample*), mis sisaldas võrdses koguses kõiki üksikuid plasmaproove.

Uuringu jaoks kogutud külmutatud etüleendiamiintetraatsetaadiga antikoaguleeritud plasma alikvoodid sulatati toatemperatuuril. Pipeteeriti 50 µl plasmat, mida eelnevalt segati automaatpipetiga, 1,5 ml mikrotsentrifuugituubidesse. Lisati 200 µl jääkülma metanooli, mis sisaldab üheksat sisestandardit (L-valiin, 13C5, 15 N; dodetsüülfosfokoliin, D38; L-karnitiin: HCl, D3; nikotiinamiid, D4; kreatiin, D3; L-fenüülalaniin, D5; hipuurhape, D5; kusihape, 15N2). Töölahuse sisestandardite kontsentratsioonid on välja toodud tabelis (Tabel 2). Lahust segati seadmel Vortex (Scientific Industries, Inc., USA) 30 sekundit. Inkubeeriti üks tund -20 °C juures. Tsentrifugeeriti 4 kraadi juures 15 min, 16 000 × g juures. Eraldati supernatant uude 1,5 ml mikrotsentrifuugituubidesse. Proovid kuivatati lämmastiku joas (*Thermo Fisher Scientific, Inc., USA*) ja lahustati 100 µl metanool-vesi segus (1:1). Sonikeeriti ultrahelivannil jääkülmas vees 1 minut ja tsentrifugeeriti 15 min 16 000 × g, 4 °C juures. Supernatant eraldati UPLC viaalidesse (*Agilent Technologies, Inc., USA*). Uurimistöö käigus teostati neli erinevat mõõtmist, mille jaoks valmistati proovid ette vahetult enne analüüsi teostamist.

**Tabel 2.** Töölahuse sisestandardite kontsentratsioonid.

Sisestandard	Töölahuse kontsentratsioon, $\mu\text{M}$
L-valiin, 13C5, 15 N	4,00
Dodetsüülfosfokoliin, D38	2,00
L-karnitiin: HCl, D3	2,00
Nikotiinamiid, D4	3,00
Kreatiin, D3	4,00
L-fenüülalaniin, D5	3,00
Hipuurhape, D5	2,00
Kusihape, 15N2	4,00

Ettevalmistatud proovidele teostati sihtmärgistatama analüüs optimeerimise käigus saadud meetodil. Plasmaproovid mõõdeti nii positiivses kui ka negatiivses ionisatsioonirežiimis, kahes korduses. Meetodi kvaliteedi hindamiseks mõõdeti nullpäeval ettevalmistatud koondplasma proove (*pooled plasma sample*) kuues korduses, et jälgida meetodi korduvust (*repeatability*), mis väljendab samadel ettevalmistus tingimustel teostatud proovide mõõtmist lühikese aja jooksul (Leito ja Viitak 2007). Korratavuse puhul hinnati erinevatel ajapunktidel tehtud  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures säilitatud plasmade mõõtetulemusi.

Korduvus ja korratavus on verifitseerimisprotsessi osad, mille eesmärgiks on kinnitada, et saadud tulemusi on võimalik korrata ning kontrollida tulemuste adekvaatsust nii kliinilises töös haiguste diagnoosimisel kui ka ravikulu jälgimisel (Imre jt 2008). Uurimistöö eesmärgiks ei olnud meetoodika põhjalik verifitseerimine, vaid oluline oli korduvuse ja korratavuse põhjal hinnata väljatöötatud meetoodika sobivust metaboliitide usaldusväärseks ja järjepidevaks mõõtmiseks ning tuvastada seeläbi ka meetoodika kitsaskohti. Korduvust esitati ühel ajapunktil ehk samal seeriamõõtmisel teostatud proovide korduva mõõtmise tulemusena (Leito ja Viitak, 2007). Korratavuse mõõtmisel oli muutujaks proovide ettevalmistamise aeg ning sel juhul hinnati erinevatel ajapunktidel tehtud mõõtmistulemusi (Leito ja Viitak, 2007, Imre jt 2008). Mõlemad

on kvantitatiivselt väljendatavad standardhälbe (*standard deviation*, SD) ja variatsioonikoeffitsienti (*coefficient of variance*, CV) kaudu (Leito ja Viitak, 2007). Andmeanalüüsis kasutati andmete väljendamiseks CV, mis on standardhälbe ja mõõtetulemuste aritmeetilise keskmise vaheline suhe, mida väljendatakse protsentides (Z-4: Mean... 1999<sup>1</sup>). Mõõtetulemused, mille variatsioonikoeffitsient jääb <10% hinnatakse väga headeks (Z-4: Mean... 1999). Variatsioonikoeffitsienti hinnates tuleb vaadelda ka keskmisi väärtusi, sest madalate kontsentratsioonide korral võib CV olla kõrge ja vastupidi (Z-4: Mean... 1999). Mõõtmiste käigus tuleb arvestada ka juhuslike vigadega (Imre jt 2008).

Kromatograafiliste mõõtmistest tingitud eripärade tõttu võivad tulemuste toorandmed olla muutlikud, sest kromatograafiliste meetodite mõõtmistel on analüütilise signaali intensiivsus põhjuslikus seoses sisestatava aine kogusega (Leito ja Viitak, 2007). Tulemuste standardiseerimisega tagatakse analüüsi täpsus, usaldusväärsus ja proovide vaheline võrreldavus, kompenseerides analüütilisi kõikumisi (Miller ja Miller, 2010). Sisestandardi (IS) valiku puhul on oluline jälgida, et aine füüsikalise-keemilised omadused oleks analüüdile võimalikud sarnased, ei häiriks analüüdi määramist ja läbiks kõik ettevalmistusetapid (Leito ja Viitak, 2007). See on oluline, et ettevalmistuse käigus tekkivad võimalikud aine vähenemised mõjuksid sarnaselt nii analüütidele kui ka sisestandarditele (Miller ja Miller, 2010).

#### **2.2.4 T-Test ja Benjamini-Hochbergi korrektsioon**

Analüüsitulemuste hindamiseks rakendati statistilise meetodina T-testi, mida kasutatakse kahe grupi keskmiste vaheliste erinevuste hindamiseks. Sellega saab tuvastada, kas kahe rühma keskmine erineb oluliselt üksteisest või mitte. Tõstatatakse hüpotees ja kui T-testi teostamise järgselt on tulemus, p-väärtus <0,05, siis hüpotees lükatakse ümber ja muutus on statistiliselt oluline. P-väärtuste kohandamiseks kasutati Benjamini ja Hochberg (1995) kirjeldatud Benjamini-Hochbergi statistilist meetodit. See aitab kontrollida valepositiivsete tulemuste hulka, hoides väiksema tõenäosuse juhuslike tekkinud p-väärtuste ( $p < 0,05$ ) esinemiseks ja seeläbi valepositiivsete tulemuste leidmiseks. Tõenäosus valepositiivseteks tulemusteks on  $p < 0,05$  korral 5%. Benjamini-Hochbergi korrektsiooni abil leitakse iga p-väärtuse jaoks kriitiline punkt, mis on oluline hüpoteesi hindamisel. Benjamini-Hochbergi korrektsiooni rakendamiseks leitakse p-väärtused hüpoteeside testimiseks, seejärel reastatakse saadud p-väärtused kasvavas järjekorras,

---

<sup>1</sup> <https://www.westgard.com/lesson34.htm>

nummerdatakse vastavalt tekkinud järjekorrale ning saadakse uus korrigeeritud p-väärtus väärtus kasutades valemit:  $N/R * p$ .

N- testitud hüpoteeside koguarv

R- p-väärtuse järjestuse aste

p- algne p-väärtus

Pärast korrektsiooni teostamist hinnatakse saadud p-väärtuste tulemusi uuesti vastavalt kriitilisele lävele ( $p < 0,05$ ) ja leitakse statistilised olulised muutujad. (Benjamini ja Hochberg, 1995)

## 2.3 Tulemused ja arutelu

Mõõtetulemused sisestati Microsoft Excel for Mac 2019 (versioon 16.29.1) programmi. Lisa 1 on toodud eksperimendi käigus saadud tulemused ning hinnang analüüdi muutumisest säilitustemperatuuri mõjul (Lisa 1, Tabel 14 ja 15).

Uurimistöö käigus teostati neli erinevat mõõtmist, mille jaoks valmistati nii üksikud kui ka koondplasma proovid ette vahetult enne analüüsi teostamist. Kuna uurimustöö eesmärgiks on võrrelda nelja erineval ajapunktil teostatud mõõtmist, siis on vajalik erinevaid seeriamõõtmisi optimeerida. Proovide ettevalmistamise käigus lisati igale doonori proovile ja tühiproovile (*blank*) võrdses koguses metanooli, mis sisaldab üheksat sisestandardit (IS), mis on loetletud ülal. Sisestandardid läbisid kõik ettevalmistusetapid. Optimaalse sisestandardi leidmiseks kasutati koondplasma (*pooled plasma sample*) proovide mõõtmisel saadud tulemusi, arvutades nende variatsioonikoefitsendi iga analüüdi kohta enne ja pärast standardiseerimist. Analüütidele sobivaimad sisestandardid on välja toodud lisa 1.

Positiivses ioonirežiimis kasutati võrdlusel sisestandardeid: L-valiin, 13C5, 15N; dodetsüülfosfokoliin, D38; L-karnitiin: HCl, D3; nikotiinamiid, D4; kreatiin, D3; L-fenüülalaniin, D5; hipuurhape, D5 ning leiti sobivaim variatsioonikoefitsendi kaudu (Lisa 1, Tabel 19). Positiivse ioonirežiimi tulemused on toodud Lisa 1 (Lisa 1, Tabel 19). Standardiseerimise järgselt langes koondplasma mõõdetud analüütide keskmine CV 30% ning <10% variatsioonikoefitsendiga oli 93% analüütidest. Pärast standardiseerimist esines ka analüüte, mille CV jäi >10%, need olid: inosiin, atseetoatsetaat, seriin, spermidiin (Lisa 1). Nende analüütide puhul olid piigid ebakorrapärased ning seetõttu halvasti integreeritavad. Neid ei loetud optimaalseteks tulemusteks ja eemaldati seetõttu edasisest andmeanalüüsist. Tulemuste optimeerimise käigus paranesid variatsiooni koefitsendid kõige rohkem metioniinil 83%, türosiinil 80%, isoleutsiinil 78%, fenüülalaniinil 77% ja metüül-4-aminobutüraatil 74% võrra.

Negatiivses ioonirežiimis kasutati optimeerimiseks sisestandardeid: L-valiin, 13C5, 15N; L-fenüülalaniin, D5; hipuurhape, D5 ja kusihape, 15N2 ning leiti sobivaim variatsioonikoefitsendi kaudu. Negatiivse ioonirežiimi tulemused on toodud Lisa 1 (Lisa 1, Tabel 20) Standardiseerimise järgselt langes koondplasma mõõdetud analüütide keskmine CV 13% võrra ning <10% variatsioonikoefitsendiga oli 75% analüütidest. Sarnaselt positiivsele ioonirežiimile esines ka negatiivses analüüte, mille koondplasma CV jäi pärast optimeerimist

>10%, need olid: kolaat, *N*-atsetüülneuraminülaat, indoksüülsulfaat, D-glükuronolaktoon, indool-3-atsetaat, ribitool, riboos, hüdroksüproliin, *N*-atsetüülalaniin, pipekolaat, treoniin, 2-hüdroksübutüraat, L-alaniin ja glütsiin. Nimetatud analüütidel esinesid integreerimisel ebakorrapärased piikide kujud. Neid ei saa lugeda optimaalseteks tulemusteks ja seetõttu eemaldati edasisest andmeanalüüsist. Standardiseerimise käigus paranesid CV kõige rohkem valiinil 83%, alfa-D-glükoosil 63%, hippuraadil 63% ja gamma-linolenaadil 53% võrra.

Korduvuse ja korratavuse mõõtmised ei olnud uurimistöö eesmärk ja seetõttu ei teostatud neid rangelt verifitseerimisprotokolliga tingimusi järgides. Tegemist oli esialgsete katsetega meetodi arendusel. Korduvuse puhul hinnati nullpäeval teostatud  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures säilitatud plasmade koondplasma analüüsides tulemusi, mõõtmised teostati kuues korduses. Positiivses ioonirežiimis jäi analüütidest 98% CV <10%, keskmine koondplasma korduvuse CV 3,5%. Negatiivses ioonirežiimis jäi analüütidest 88% CV <10%, keskmine koondplasma korduvuse CV oli 4,6%. Mõlemal juhul jäid keskmised CV <5%, mida loetakse analüütilises keemias väga headeks tulemusteks.

Korratavuse puhul hinnati erinevatel ajapunktidel teostatud  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures säilitatud plasmade mõõtetulemusi. Ainus muutuja korratavuse puhul oli analüüsi teostamise aeg. Positiivse ioonirežiimi korral oli korratavuse keskmine CV 20,45% ning <10% oli 19% analüütide CV tulemustest. Negatiivse režiimi korral oli keskmine CV 42,91% ning <10% jäi 38% analüütide CV tulemusest. Nende tulemuste korral saab järeldada, et üheks järgmiseks meetoodika arenduse eesmärgiks oleks mõõteseriade vahelise võrreldavuse parandamine. Selleks tuleb teostada meetoodika edasine optimeerimine. Kirjanduse andmetel soovitatakse kromatograafiliste analüüsides korral kasutada eksperimentaalsete proovide kõrval ka pikaajalisi kontorollproove, mille tulemused on teada (Fomenko jt., 2022). Partiide vahelise mõõtmise parandamiseks on välja töötatud ka  $^{13}\text{C}$ -isotoopmärgistusega sisestandardina kasutatav pärmiekstrakt, mis sisaldab suurt osa endogeensetest metaboliitidest (Iroatech<sup>2</sup>). Kontrollproovide ja laiema katvusega sisestandardi lisamine igale seeriamõõtmisele tagaks parema proovide reprodutseeritavuse.

Kõikidel seeriamõõtmistel teostati igal valitud temperatuuril säilitatud plasmade koondplasma analüüsi mõõtmine kolmes korduses. Leiti keskmised väärtused. Kuna korratavuse hindamisel ei saadud optimaalseid tulemusi ja kirjanduse andmetel on enamik plasma metaboliite pärast

---

<sup>2</sup> <https://www.iroatech.com/iroa-yeast-internal-standard-qc-workflow-kit/>

tsentrifugimist stabiilsed temperatuuril  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Moriya jt., 2016), siis teostati temperatuuride võrdlus alati samal ajapunktil säilitustingimustel  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  saadud tulemustega. Tulemuste võrdlemiseks püstitati nullhüpotees, et erinevatel temperatuuridel säilitatud plasmadele teostatud metaboolse profiili mõõtmisel analüütide kontsentratsioonides erinevusi ei esine. Tulemuste analüüsiks teostati kahepoolset T-testi, kus võrreldi samal päeval erinevatel temperatuuridel säilitatud plasmade mõõtmistulemusi. Kasutati muuthajuva dispersiooni funktsiooni, eeldusel, et jaotuse dispersiooni kohta info puudub ja seda ka eraldi ei testitud. Saadud T-testi tulemustele rakendati Benjamini-Hochbergi korrektsiooni. Metaboliitide tulemuste olulisuse hindamiseks seati täiendav tingimus, et saadud tulemuste vahel on diagnostiliselt oluline muutus, kui tulemused erinevad vähemalt 20% võrra. Saadud tulemusi kirjeldatakse järgnevalt.

Positiivses ioonirežiimis ajapunktidel 7. ja 28. päev leiti  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  kraadi ja  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kraadi võrdluses serotoniinil 31% ja 30% tõus. Tulemused on toodud tabelis (Tabel 3). Hiljem ega  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures serotoniini tõusu ei leitud. Stabiilsuse uuringus toob Yang jt. (2013) välja, et serotoniini tõus võib olla ka tingitud trombotsüütide jääkidest plasmas, sest analüüt paikneb veres peamiselt vereliistakutes. On tõdetud, et ka  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  säilitustingimustel võivad vererakud olla veel aktiivsed ning sellest võib tuleneda ebaselge serotoniini tõus plasmas (Yang jt., 2013). Serotoniini tasemes ei leidnud Kamlage jt. (2014) 16 tundi toatemperatuuril säilitatud plasmas muutusi, kuid tsentrifugimiseelne viivitus tingis kontsentratsiooni languse, mis ei kattu magistritöös saadud tulemustega. Hinnates üksikute patsientide proovide muutusi, siis koondplasmaga sarnast tõusu leiti vaid kahes plasmas. Seega mõjutab kahe üksiku plasma serotoniini tõus ka koondplasma tulemust. Magistritöös teostatud eksperimendis võib tegemist olla ebaselge muutusega. Samas ei tohiks ka ebaselget muutust laboratoorsetes analüüsides märkamata jätta. Serotoniini taseme tõus veres võib olla seotud teatud ravimite või toidulisandite liigtarvitamisega ja selline valepositiivne leid võib klinitsistidele anda vale informatsiooni (Mayoclinic, *Mayo Foundation for Medical Education and Research*<sup>3</sup>).

**Tabel 3.** Serotoniini kontsentratsiooni muutused  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  säilitustingimustel.

Analüüt	Ioonirežiim	0. päev	7. päev	28.päev	56. päev
Serotoniin	Positiivne	100%	131%	130%	114%

<sup>3</sup> <https://www.mayoclinic.org/>

Positiivses ioonirežiimis teisel ajapunktil ehk 7. päeval leiti 4 °C säilitustingumustel olnud plasmades putresiini 23% langus (Tabel 4). Putresiini langus tuvastati ka hilisemates ajapunktides, vastavalt 41% ja 50% (Tabel 4). Madalamal temperatuuril jäi analüüt stabiilseks. Negatiivses ioonirežiimis putresiini kontsentratsiooni ei mõõdetud ja seega puudub võrdlusvõimalus. Analüüdil leiti kõigis üksikutes plasmaproovides langus samas suurusjärgus. Kirjanduse ülevaates vaadeldud uuringu tulemustes putresiini kontsentratsioonide muutusi välja ei toodud. Putresiin on seotud rakkude kasvuga ning selle langus võib tähendada, et rakkude kasv ja jagunemine on pärsitud (Marshall jt., 2014). Plasma pikaajalises säilitamisel on selline muutus loogiline, aga kui laboris saadakse valepositiivne tulemus võib see viidata polüamiinidega seotud sünteesi häiretele (Marshall jt., 2014). Lisaks on amiinid tundlikud oksüdatsiooni suhtes või on langus põhjustatud diaminooksidaasi ensümaatilise aktiivsuse säilimisest (Mayoclinic).

**Tabel 4.** Putresiini, tauriini ja L-ornitiini kontsentratsioonide muutused 4 °C säilitustingimustel.

Analüüt	Ioonirežiim	0. päev	7. päev	28.päev	56. päev
Putresiin	Positiivne	100%	77%	59%	50%
Tauriin	Positiivne	100%	137%	118%	129%
L-ornitiin	Positiivne	100%	129%	142%	159%

Tauriini kontsentratsioonides leiti tõus alates teisest ajapunktist 4 °C säilitustingimustel (Tabel 4). Aminohappel esines sarnane tõus mõlemas ioonirežiimis. Madalamal temperatuuril jäi analüüt stabiilseks. Kamlage jt. (2014) tauriini kontsentratsioonis toatemperatuuril 16 tunni jooksul muutusi ei täheldanud, ajaperioodide mittekattuvuse tõttu tulemusi võrrelda ei ole võimalik. Üksikute plasmade tulemuste analüüsil selgus, et tõus tauriini kontsentratsioonis esines 80% doonoritest, 20% jäi analüüt stabiilseks. See tingib olukorra, kus vajalikud oleksid edasised uuringud suurema patsientide hulgaga, et püstitada tauriini tõusu hüpotees. Vead säilitustingimustel võivad põhjustada ebakorrektsid viiteid põletikule organismis, liigsele toidulisandite või energijookide tarbimisele (Mayoclinic). Tauriini kontsentratsiooni tõus võib viidata ka suurele füüsilisele koormusele ja stressile, kuna tauriin aitab reguleerida lihaste funktsiooni (Marshall jt., 2014).

Positiivse ioonirežiimi 4 °C säilitustingimuste leiti statistiliselt oluline tõus L-ornitiinil (Tabel 4). Üksikute plasmaproovide tulemustes esines muutus kõigil samas suurusjärgus. Madalamal temperatuuril säilitatuna püsis aminohappe kontsentratsioon stabiilsena. L-ornitiini negatiivses ioonirežiimis ei tuvastatud ja seega ei saa tulemusi võrrelda. L-ornitiini kasutatakse toidulisandina ja sellest võib olla tingitud ajutine tõus veres (Marshall jt., 2014). L-ornitiini taseme tõus võib viidata hüperornitineemiale, mille puhul peaks tõusnud olema ka ammoniaagi tase veres (Marshall jt., 2014).

Positiivses ioonirežiimis alates kolmandast ajapunktist ehk 28. päevast leiti 4 °C säilitustingimustel olnud plasmades statistiliselt oluline muutus analüütidel: glutamiin ja asparagiin. Tulemused on välja toodud ka allpool toodud tabelis (Tabel 5). Glutamiinil oli langus kolmandas ajapunktis 30% ja neljandas 66%, asparagiinil olid langused vastavalt 56% ja 83% (Tabel 5). Negatiivses ioonirežiimis olid mõlema analüüdi kontsentratsioonide langused samas suurusjärgus. Mõlema analüüdi langused esinesid ka doonorite üksikproovides. Selline suur muutus ja laboripoolne ebakorrekne säilitustingimuste rakendamine võib kliinitsistid juhatada valepositiivsete diagnoosideni. Madal asparagiini kontsentratsioon võib viidata ka asparagiini süntetaasi defitsiidile (Blau jt., 2014). Asparagiini madal kontsentratsioon veres võib viidata hüpotooniale (madal lihastoonus) või hüperrefleksiast tingitud kontrollimatutele liigutustele (Marshall jt., 2014). Glutamiini kontsentratsiooni langus plasmas võib viidata mitmele ainevahetushaigusele: vahtrasiirupitõbi, propionaatatsiduuria, metüülmalonaatatsiduuria ja glutamiini süntetaasi defitsiit (Blau jt., 2014). Madal glutamiini sisaldus veres võib viidata stressile, mis võib olla põhjustatud ka haigusest, samuti valgu vähesele dieedile (Marshall jt., 2014).

Glutamiini ja asparagiini langust erinevatel temperatuuridel säilitatud plasmas on täheldatud ka varem. Kamlage jt (2012) tõi oma uuringus välja, et asparagiin ja glutamiin muutuvad aja möödudes tõenäoliselt enda dikarboskühülhappe analoogideks aspartaadiks ja glutamaadiks. Glutamiinil –20 °C säilitustingimustel olulisi muutusi ei täheldatud (Tabel 6). Asparagiinil esines –20 °C säilitustingimustel kolmandas ajapunktis kerge tõus, kuid seda oluliseks muutuseks ei loetud, sest järgnevalt oli analüüt stabiilne. Selle eksperimendi tulemuste põhjal saame järeldada, et asparagiini ja glutamiini kontsentratsioon püsib muutumatuna korrektsete preanalüütiliste tingimuste täitmisel, säilitades teda vähem kui üks nädala kuni 4 °C juures (Tabel 5, 6).

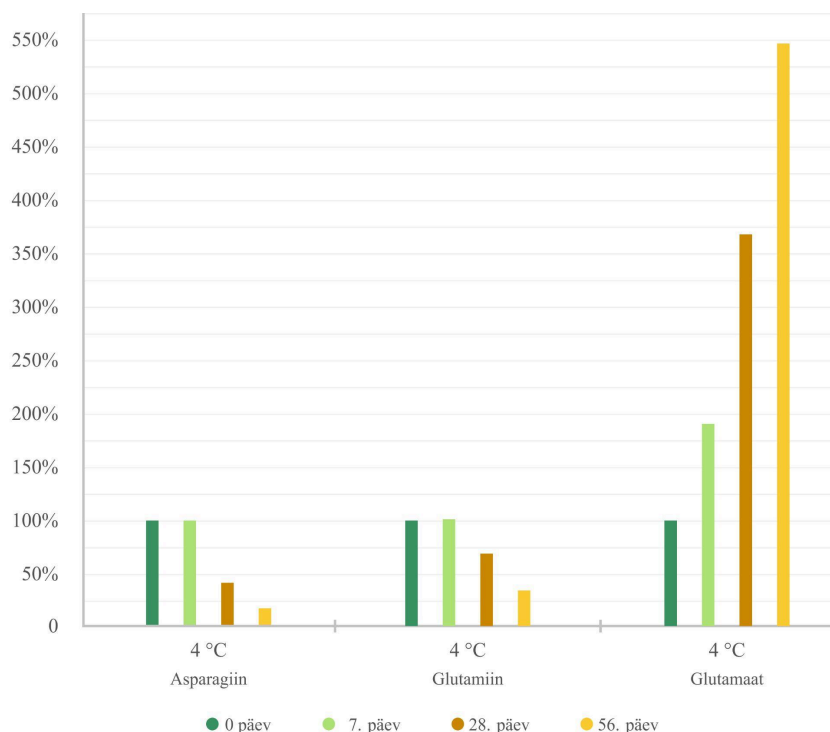
**Tabel 5.** Asparagiini, glutamiini ja glutamaadi kontsentratsioonide muutused 4 °C säilitustingimustel.

Analüüt	Ioonirežiim	0. päev	7. päev	28.päev	56. päev
Asparagiin	Positiivne	100%	100%	44%	17%
Glutamiin	Positiivne	100%	102%	70%	34%
Glutamaat	Negatiivne	100%	187%	367%	545%

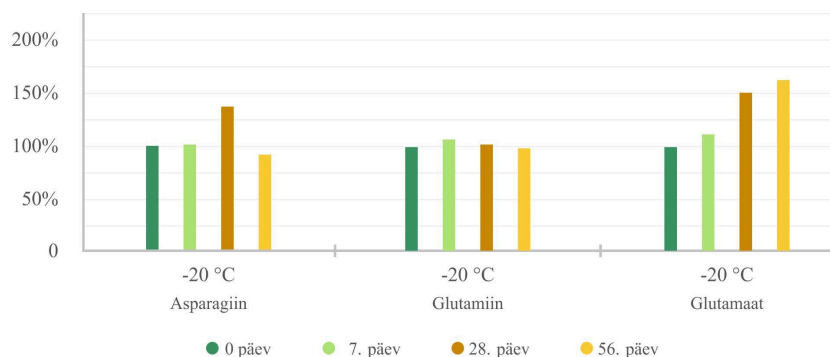
**Tabel 6.** Asparagiini, glutamiini ja glutamaadi kontsentratsioonide muutused –20 °C säilitustingimustel.

Analüüt	Ioonirežiim	0. päev	7. päev	28.päev	56. päev
Asparagiin	Positiivne	100%	101%	138%	93%
Glutamiin	Positiivne	100%	109%	102%	99%
Glutamaat	Negatiivne	100%	115%	150%	161%

Kirjanduse andmetel toimub glutamiini teisenemine glutamaadiks kõrgemal kui –80 °C säilitustingimustel (Kamlage jt., 2014). Glutamaadi kontsentratsiooni mõõdeti vaid negatiivses ioonirežiimis, 50% tõus leiti –20 °C säilitustingimustel kolmandas ajapunktis ehk 28. päeval (Tabel 6). Viimases ajapunktis oli glutamaat tõusnud 61% võrra (Tabel 6). Glutamaadi tõus toimus ka 4 °C säilitustingimustel, kus teisel ajapunktil oli tõus 87% võrra, kolmandal ajapunktil leiti 3,5 kordne ja neljandal 5,5 kordne tõus (Tabel 5). Glutamaadi muutused üksikutes plasmades olid sarnased koondplasma tulemustega. Kõrge kontsentratsioon veres võib viidata ainevahetus häiretele: glutamiinhappe atsideemia ja glutamiini süntetaasi defitsiit (Blau jt., 2014). Aspartaadi kontsentratsiooni eksperimendis ei mõõdetud. Asparagiini, glutamiini ja glutamaadi muutused on visualiseeritud joonistel 1 ja 2 (Joonis 1 ja 2).



**Joonis 1.** Asparagiini, glutamiini ja glutamaadi kontsentratsioonide muutused 4 °C säilitustingimustel. Iga analüüdi vasakpoolne tulp tähistab esialgset kontsentratsiooni (100%). Järgnevad tulbad väljendavad analüüdi kontsentratsiooni suhtelist muutust erinevatel ajahetkedel võrreldes esialgse mõõdetud sisaldusega proovis.

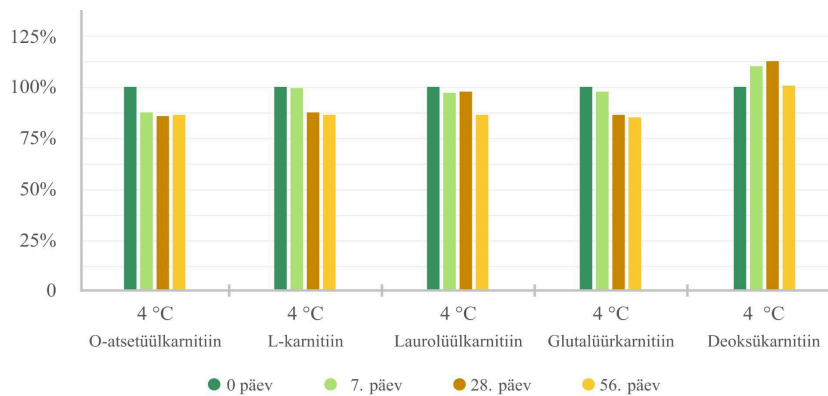


**Joonis 2.** Asparagiini, glutamiini ja glutamaadi kontsentratsioonide muutused -20 °C säilitustingimustel. Iga analüüdi vasakpoolne tulp tähistab esialgset kontsentratsiooni (100%). Järgnevad tulbad väljendavad analüüdi kontsentratsiooni suhtelist muutust erinevatel ajahetkedel võrreldes esialgse mõõdetud sisaldusega proovis.

Positiivses ioonirežiimis leiti 4 °C säilitustingimustel üldine langustrend karnitiinide kontsentratsioonides (Tabel 7). Tingimustele, et analüüdi kontsentratsiooni muutus peab olema vähemalt 20%, vastas magistritöö eksperimendis 56. päeval ainult glutarüülkarnitiin (Tabel 7). Teiste karnitiinide langus oli väiksem ja deoksükarnitiini kontsentratsioon jäi kogu eksperimendi jooksul stabiilseks (Tabel 7). Karnitiinide muutused 4 °C säilitustingimustel on visualiseeritud ka joonisel (Joonis 3). Karnitiinide aeglast lagunemist on märkinud ka Haid jt. (2018), kelle andmetel võib põhjuseks olla karnitiini ja rasvhapete vaheliste estersidemete hüdrolüüs. Madalamal temperatuuril säilisid karnitiinide kontsentratsioonid stabiilsetena. Muutused üksikutes plasmades olid sarnased koondplasma tulemustega. Negatiivses ioonirežiimis karnitiinide kontsentratsioone ei mõõdetud.

**Tabel 7.** Karnitiinide kontsentratsioonide muutused 4 °C säilitustingimustel.

Analüüt	Ioonirežiim	0. päev	7. päev	28.päev	56. päev
O-atsetüülkarnitiin	Positiivne	100%	87%	83%	84%
L-karnitiin	Positiivne	100%	99%	87%	84%
Laurolüülkarnitiin	Positiivne	100%	92%	93%	83%
Glutarüülkarnitiin	Positiivne	100%	95%	85%	80%
Deoksükarnitiin	Positiivne	100%	108%	113%	101%



**Joonis 3.** Karnitiinide kontsentratsioonide muutused 4 °C säilitustingimustel. Iga analüüdi vasakpoolne tulp tähistab esialgset kontsentratsiooni (100%). Järgnevad tulbad väljendavad analüüdi kontsentratsiooni suhtelist muutust erinevatel ajahetkedel võrreldes esialgse mõõdetudsisaldusega proovis.

Kolmandas ajapunktis leiti nukleosiid metüüladenosiini kontsentratsioonis 4 °C säilitustingimustel 42% ja viimases 61% langus (Tabel 8). Nukleosiidi on osaline tRNA (*transfer Ribonucleic acid*) struktuuri ja funktsiooni stabiliseerija (Marshall jt., 2014). Magistritöö eksperimendis ei ole võimalik eristada 1-metüüladenosiini ja 3-metüüladenosiini, seega ei saa tulemusi kirjanduse andmetega otseselt võrrelda. On leitud Moriya jt. (2016) uuringus 1-metüüladenosiini kontsentratsiooni stabiilsus toatemperatuuril, kuid siinkohal neid tulemusi võrrelda ei saa. Diagnostiliselt võib analüüdi langus viidata häiretele RNA metüleerimisprotsessides, mis on oluline geeniekspressiooni reguleerimisel (Marshall jt., 2014).

Karboksüülhappe 1-aminotsüklopropanokarboksülaadi kontsentratsiooni leiti oluline, 30% langus viimases ajapunktis (Tabel 8). Karboksüülhape on oluline neuronite funktsioneerimise kindlustaja (Marshall jt., 2014). Tutvutud uuringutes karboksüülhapet ei analüüsitud ja seega puudub võrdlusvõimalus. Madalamal temperatuuril säilitatuna püsisid mõlema analüüdi kontsentratsioonid stabiilsena. Langused üksikutes plasmades olid mõlema analüüdi korral sarnased koondplasma tulemustega.

**Tabel 8.** Metüüladenosiini, 1-aminotsüklopropaan-karboksülaadi ja L-alaniini kontsentratsioonide muutused 4 °C säilitustingimustel.

Analüüt	Ioonirežiim	0. päev	7. päev	28.päev	56. päev
Metüül-adenosiin	Positiivne	100%	93%	58%	39%
1-aminotsüklopropaan-karboksülaad	Positiivne	100%	93%	84%	70%
L-alaniin	Positiivne	100%	122%	113%	142%

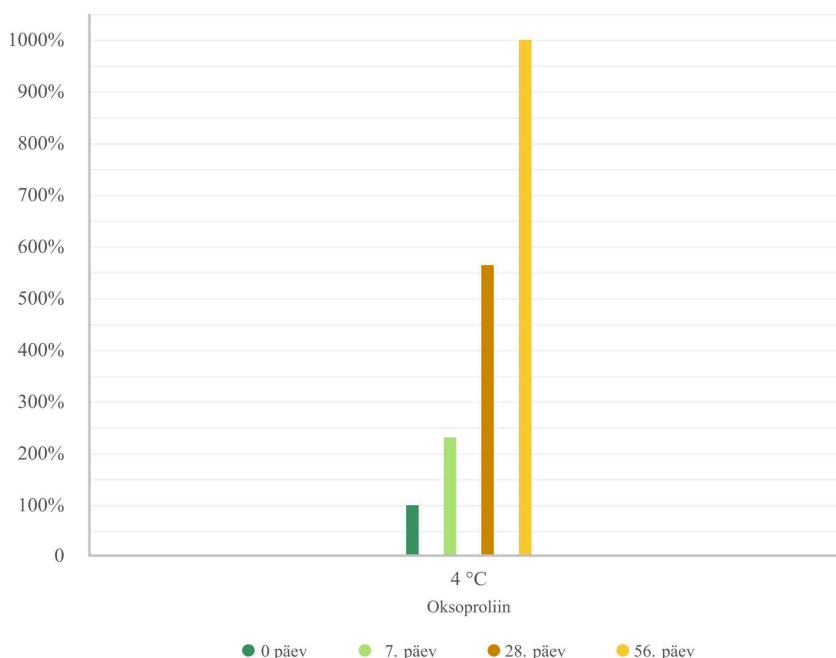
Positiivse ioonirežiimi 4 °C säilitustingimuste mõõtmiste viimases ajapunktis leiti statistiliselt oluline tõus L-alaniinil, 42% (Tabel 8), sarnane tõus leiti ka kõikides üksikutes plasmaproovides. L-alaniini mõõdeti negatiivses ioonirežiimis, kuid eemaldati andmeanalüüsist liialt suure CV tõttu, seega puudub võimalus võrdluseks. Madalamal temperatuuril säilitatuna püsis aminohappe kontsentratsioon stabiilsena. Kamlage jt. (2014) tuvastasid samuti alaniini muutuse toatemperatuuril 16 tunni jooksul, kuid magistritöös leitud eksperimendis võib alaniini stabiilseks lugeda 4 °C säilitustingimustel kuni 28 päeva. Alaniin on oluline koostisosa valkude moodustamisel, olles ka oluline lihaste ja kesknärvisüsteemi energiaallikas (Marshall jt. 2014). Alaniini kontsentratsiooni tõus plasmas võib viidata lihaste kurnatusele (Mayoclinic). Samuti ka ainevahetushaigustele: laktaatsidoos, pürovaadi metabolismi häired, mitokondriaalsed häired, hüperammonaemia sündroom, samuti glükagooni retseptori defektile (Blau jt., 2014). Edasistes metaboliitide stabiilsuse uuringus võib viimati nimetatud analüüte veel kord testida, et kontrollida nende muutlikkust temperatuuri mõjul.

Järgnevalt kirjeldatakse veel olulisi negatiivse ioonirežiimi tulemusi. Teises ajapunktis ehk 7. päeval 4 °C säilitustingimustel täheldati oksoprolüüsi kahe kordset tõusu, järgmises ajapunktis oli muutus viiekordne ja viimases kümnekordne (Tabel 9, Joonis 4). Sarnane tõus esines ka kõigis kümnes üksikus plasmaproovis. Eksperimendi tulemused ühtivad Moriya jt. (2016) tulemustega, kus oksoprolüüsi tõusu leiti 4 °C säilitustingimustel, kuid madalamal temperatuuril jäi analüüdi kontsentratsioon stabiilseks. Positiivses ioonirežiimis analüüti ei tuvastatud. Kahe uuringu põhjal saab järeldada, et oksoprolüüsi lühiajaliseks säilitamiseks sobib ka kõrgem temperatuur kui –80 °C.

Oksoproliin ehk 5-oksoproliin, tuntud ka kui püroglutamiinhape, on aminohapete ainevahetuse vaheühend, kuuludes aminohappe derivaatide hulka (Marshall jt., 2014). Oksoproliin moodustub glutamaadi dehüdratsiooni tulemusena, mistõttu võib olla tema kontsentratsioon ajas kasvanud (Kumar ja Bachhawat, 2012). Diagnostiliselt võib oksoproliooni kuhjumine viidata ainevahetushaigusele 5-oksoprolinuuria (Marshall jt., 2014). Kuid kui laboris on saadud valepositiivsed tulemused säilitustingumuste ebastabiilsuse tõttu, kahandab sellise vastuse väljastamine labori usaldusväarsust.

**Tabel 9.** Oksoproliooni kontsentratsiooni muutused 4 °C säilitustingimustel.

Analüüt	Ioonirežiim	0. päev	7. päev	28.päev	56. päev
Oksoproliin	Negatiivne	100%	239%	564%	1000%



**Joonis 4.** Oksoproliooni kontsentratsioonide muutus 4 °C säilitustingimustel. Analüüdi vasakpoolne tulp tähistab esialgset kontsentratsiooni (100%). Järgnevad tulbad väljendavad analüüdi kontsentratsiooni suhtelist muutust erinevatel ajahetkedel võrreldes esialgse mõõdetud sisaldusega proovis.

Negatiivse ioonirežiimi teises ajapunktis 4 °C säilitustingimustel leiti 40% püridoksaali tõus, mis hiljem jäi stabiilseks (Tabel 10). Tõusud üksikutes plasmades olid sarnased koondplasma tulemustega. Madalamal temperatuuril säilitatuna püsis vitamiini kontsentratsioon stabiilsena. Positiivses ioonirežiimis analüüti ei mõõdetud ja seega puudub võrdlusvõimalus. Püridoksaal ehk vitamiin B6 osaleb erinevate metaboliitide: valkude, lipiidide, süsivesikute, koensüümide ja hormoonide ainevahetusprotsessides (Marshall jt. 2014). Organismil on vaja vitamiin B6 normaalseks ajuarenguks, samuti närvi- ja immuunsüsteemi toimimiseks (Mayoclinic). Selle liigne tarbimine võib põhjustada erinevaid sümptomeid: ataksia, tuimus, iiveldus (Mayoclinic).

**Tabel 10.** Püridoksaali kontsentratsiooni tõus 4 °C säilitustingimustel.

Analüüt	Ioonirežiim	0. päev	7. päev	28.päev	56. päev
Püridoksaal	Negatiivne	100%	139%	142%	132%

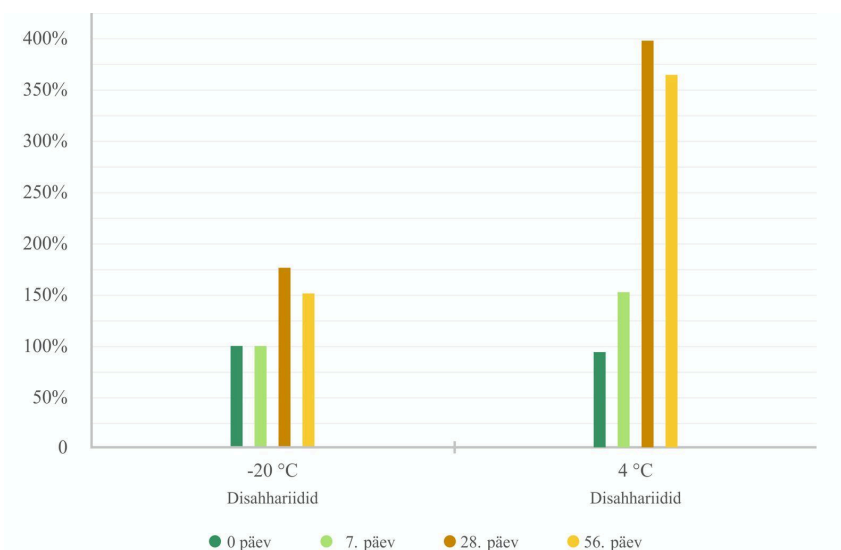
Negatiivses ioonirežiimis leiti oluline muutus disahhariidide kontsentratsioonis mõlemal temperatuuril (Tabel 11 ja 12). Kolmandas ajapunktis –20 °C säilitustingimustel leiti temperatuuride võrdlusel disahhariidide kontsentratsioonis 77% tõus, mis püsis neljandal mõõtmisel samas suurusjärgus (Tabel 12). Kõrgemal temperatuuril esines 28. päeva mõõtmisel kolmekordne tõus (Tabel 11), mis püsis sarnaselt –20 °C viimases punktis samas suurusjärgus (Tabel 12). Kõikides üksikutes proovides esines koondplasmale sarnane muutus. Disahhariidide muutused on visualiseeritud joonisel (Joonis 5). Proovides leidub mitmeid sama molekulmassiga disahhariide, mille eristamine üksteisest antud eksperimendis polnud võimalik. Seega ei saa kindlalt väita, millise analüüdiga on tegu. Kamlage jt (2014) leidsid maltoosi kontsentratsiooni tõusu plasmas kõrgemal kui 4 °C säilitustingimustel.

**Tabel 11.** Disahhariidide kontsentratsiooni muutused 4 °C säilitustingimustel.

Analüüt	Ioonirežiim	0. päev	7. päev	28.päev	56. päev
Disahhariidid	Negatiivne	100%	156%	398%	368%

**Tabel 12.** Disahhariidide kontsentratsiooni muutused –20 °C säilitustingimustel.

Analüüt	Ioonirežiim	0. päev	7. päev	28.päev	56. päev
Disahhariidid	Negatiivne	100%	100%	177%	152%



**Joonis 5.** Disahhariidide kontsentratsiooni muutused  $-20\text{ °C}$  ja  $4\text{ °C}$  säilitustingimustel. Analüütide vasakpoolne tulp tähistab esialgset kontsentratsiooni (100%). Järgnevad tulbad väljendavad analüüdi kontsentratsiooni suhtelist muutust erinevatel ajahetkedel võrreldes esialgse mõõdetud sisaldusega proovis.

Valiini 20% tõus tuvastati koondplasmas nii kolmandas kui ka neljandas ajapunktis  $4\text{ °C}$  säilitustingimustes (Tabel 13). Üksikute plasmaproovide analüüsis selgus, et 20% jäi analüüt stabiilseks, 60% tõusis ning 20% plasmades kontsentratsioon langes. Tulemustes on valiini kontsentratsioon väga muutlik ja seega võib leitud tõus olla ka juhuslik viga. Madalamal temperatuuril püsis aminohappe kontsentratsioon stabiilsena. Koondplasma tulemused ei ühti Kamlage jt. (2014) saadud tulemustega, kus valiini kontsentratsioonis täheldati minimaalset langust. Samuti tuvastati selles uuringus valiin ainult negatiivses ioonirežiimis ja tulemusi võrrelda ei saa. Tulemuste ebaselguse tõttu peaks järgnevates uuringutes valiini stabiilsuse mõõtmisi kordama, suurendades patsientide hulka, et püstitada analüüdi muutuse kohta hüpotees. Valiini kontsentratsiooni tõus plasmas võib viidata ainevahetushaigustele: vahtrasiirupi tõbi ja hüpervalineemia (Blau jt., 2014).

**Tabel 13.** Valiini, gamma-linolenaadi ja 2,3-diaminopropionaadi kontsentratsioonide muutused 4 °C säilitustingimustel.

Analüüt	Ioonirežiim	0. päev	7. päev	28.päev	56. päev
Valiin	Negatiivne	100%	90%	159%	123%
Gamma-linolenaat	Negatiivne	100%	98%	153%	195%
2,3-diaminopropionaat	Negatiivne	100%	104%	67%	34%

Gamma-linolenaadi tõusu täheldati 4 °C säilitustingimustes nii kolmandas kui ka neljandas ajapunktis, vastavalt 53% ja 95% (Tabel 13). Madalamal temperatuuril püsis analüüdi kontsentratsioon stabiilsena. Rasvhapete kontsentratsioonide muutusi on märgitud ka kirjanduses (Moriya jt., 2016). Gamma-linolenaadil ehk oomega-6 rasvhappel on oluline roll närvisüsteemi ja organismi üldises arengus (Marshall jt., 2014).

Aminohappe derivaadil 2,3-diaminopropionaadil leiti oluline langus 4 °C säilitustingimustel kahes viimases ajapunktis, vastavalt 33% ja 66% (Tabel 13). Kõikides üksikutes proovides esines koondplasmale sarnane muutus. Kogu eksperimendi jooksul jäi 2,3-diaminopropionaat –20 °C säilitustingimustel stabiilseks. Seega kontsentratsioon püsib –20 °C juures kuni kaks kuud stabiilsena. Uuringu jaoks vaadeldud kirjanduses analüüdi kontsentratsioonide muutusi ei käsitletud. Üksikute plasmade tulemustes oli üks proov, mis oli langenud teistest 2,5 korda rohkem ja mis tingis suure muutuse ka koondplasmas. Kuid kõikides plasmades esines siiski langustrend. Seega võib järgnevates uuringutes aminohappe derivaadi stabiilsust 4 °C säilitustingimustes täiendavalt analüüsida.

Positiivses ioonirežiimis esines 56. päeva möödudes 4 °C säilitustingimustel oluline muutus 20% ja –20 °C säilitustingimustel 2% analüütidest ehk ühel analüüdil, serotoniinil. Serotoniini tõus ainult 7. ja 28. päeva mõõtmisel –20 °C säilitustingimuste korral. Kõrgemal temperatuuril muutust ei täheldatud. Seega võib tegemist olla analüütilise veaga. Positiivse ioonirežiimi tulemustest saab järeldada, et enamik analüüte on –20 °C säilitustingimustel stabiilsed kuni üks nädal, mis ühtib Pinto jt. (2014) tulemustega.

Negatiivses ioonirežiimis esines 56. päeva möödudes 4 °C säilitustingimustel oluline muutus 25% ja –20 °C säilitustingimustel 5% analüütidest ehk kahel analüüdil. Negatiivses ioonirežiimis leiti glutamaadi ja disahhariidide tõus –20 °C säilitustingimuste korral. Kuid kuni nädal olid kõik mainitud analüüdid stabiilsed ka kõrgemal temperatuuril kui –80 °C. Negatiivse ioonirežiimi tulemustest saab järeldada, et enamik analüüte on –20 °C säilitustingimustel stabiilsed, kuid kindlasti tuleb oluliste kvaliteedimarkeritena arvestada eelpool mainitud.

Magistritöös leitud aminohappe derivaadi 2,3-diaminopropionaadi langustrendi väljaselgitamine vajaks edasisi stabiiluse uuringuid, sest magistritöös esines koondplasma hulgas üks teistest kõrgema langustrendiga plasma. Samuti vajavad edasisi uuringuid valiini ja tauriini kontsentratsioonides leitud ebastabiilsused.

Mõlemas ioonirežiimis oli ka analüüte, mis jäid stabiilseks ja mille tulemused kattuvad ka varem teostatud uuringutega. Magistritöös teostatud uuringus jäid metioniini kontsentratsioon stabiilseks, tulemused ühtivad Kamlage jt. (2014) ja Moriya jt. (2016) tulemustega. Samuti ühtivad eksperimendi tulemused Kamlage jt. (2014) tulemustega, kus muutusi ei leitud proliini, trüptofaani, leutsiini ja ketoleutsiini kontsentratsioonides. Samas kui Pinto jt. (2014), täheldasid proliini tõusu.

Kirjanduses leitava informatsiooni kohaselt, lisaks eelnevatele stabiilsetele analüütidele, muutuvad glutamiin ja asparagiin enda dikarboksüülhappe analoogideks. Glutamiini ja asparagiini langust ning glutamaadi tõusu täheldati 4 °C säilitustingimustel ka magistritöös. Neid analüüte võib lugeda siinkohal kvaliteedimarkeriteks, mis näitavad, et säilitustemperatuur ei olnud piisav metaboolsete muutuste peatamiseks.

Uuringusse kaasatud vabatahtlike doonorite valim oli väike, kuid meeste ja naiste osakaal jagunes võrdselt. Kõik doonorid olid hea üldise enesetundega ning erinevas vanuses, kattes kõik vanuserühmad 20–65 aastaste seas. Metaboliitide hulgas on ebastabiilseid analüüte, mis vajavad standardiseeritud preanalüütilist ettevalmistust. Saadud tulemused loovad baastadmised analüütide kontsentratsioonide muutlikkuse kohta lühema perioodi jooksul kõrgemal kui –80 °C säilitustingimustel. Magistritöös saadud informatsioon aitab tulevikus hinnata kliinilises töös saadavaid tulemusi, et kindlustada labori töövoos adekvaatsus ja hoiduda klinitsistidele valepositiivsete analüüsivastuste väljastamisest.

## Kokkuvõte

Magistritöö üldiseks eesmärgiks oli välja selgitada metaboolseks analüüsiks sobivad vereplasma säilitustingimused. Kirjanduse andmetel tagab plasma säilitamine  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures metaboolse profiili reprodutseeritavuse, kuid kõrgematel temperatuuridel võivad mõnede analüütide kontsentratsioonides esineda muutused. Eelnevalt läbiviidud uuringutes on plasmasid säilitatud väga erinevatel temperatuuridel, kuid ajavahemikud on olnud kliinilise töövoos mõistes liiga lühikesed või pikad, ulatudes ööpäeva pikkustest kuni mitme aastaste uuringuteni. Eksperiment oli oluliseks aluseks metaboolika meetodite arendusel SA TÜK Geneetika ja personaalmeditsiini kliinikus, et hiljem meetodit rakendada ka kliinilises töös. Igapäevases töös võib tekkida vastava aparatuuri puudumisel olukord, kus plasma viimine  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  juurde pole koheks võimalik. Seetõttu hinnati eksperimendis doonori plasmade metaboliitide sisaldust erinevates ajapunktides pärast proovi võtmist, säilitades vereplasmasid kolmel erineval temperatuuril ning võrreldi kirjanduses avaldatud andmetega.

Töö tulemustes tõdeti, et enamus metaboliite on lühiajaliselt  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  säilitustingimustel stabiilsed. Kõrgemal temperatuuril,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  säilitustingimustel, on metaboliitide kontsentratsioonid muutlikumad ja juba ühe nädalane säilitamine võib mõjutada analüüsitulemusi. Tulemustes esines ka analüüte, mille kontsentratsioon jäi kogu uuringu vältel stabiilseks ja mitmeid neist kinnitasid ka eelnevalt avaldatud andmed (Kamlage jt., 2014, Moriya jt., 2016). Samuti kattusid eksperimendi tulemused juba eelnevalt kirjanduses säilitustemperatuuri suhtes tundlikutena väljatoodud analüütidega. Neid analüüte võib lugeda siinkohal kvaliteedimarkeriteks, mis näitavad, et säilitustemperatuur ei olnud piisav metaboolsete muutuste peatamiseks.

Positiivses ioonirežiimis tuvastati kõrgemal temperatuuril mõnede aminohapete, ühe karnitiini, nukleosiidi ja karboksüülhappe derivaadi ja polüamiini kontsentratsioonide muutused, mida võrreldi kirjanduses avaldatud andmetega. Negatiivses ioonirežiimis tuvastati  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  säilitustingimustel disahhariidide ja glutamaadi kontsentratsioonide muutused, mis ühtivad kirjanduses avaldatud andmetega ja mida on hea kasutada preanalüütiliste kvaliteedimarkeritena. Kõrgemal temperatuuril esinesid muutused lisaks eelnevatele ka mõningate aminohapete, ühe rasvhappe ja B-grupi vitamiini kontsentratsioonides. Seega tulemused ühtivad kirjanduse andmetega, et kuni üks nädal  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  säilitustingimustel hoitud plasmade metaboolsed profiilid on stabiilsed (Yin jt., 2013, Kamlage jt., 2014, Pinto jt., 2014, Haid jt., 2018). Kõrgemal

temperatuuril säilitatuna aga esineb metaboliitide kontsentratsioonides muutusi ning analüüsitulemusi adekvaatselt hinnata ei ole võimalik.

Eksperimendi tulemustes esinesid mõningad analüüdid: seriini aminohappe derivaat 2,3-diaminopropionaat ning aminohapped valiin ja tauriin, mille stabiilsused vajaksid edasisi uuringuid. Aminohappe derivaadi üksikute plasmade tulemustes leiti langustrend, kuid nende hulgas oli üks proov, mis oli langenud teistest 2,5 korda rohkem. See mõjutab koondplasma tulemusi. Seega võib järgnevates uuringutes 2,3-diaminopropionaaadi kontsentratsiooni langust 4 °C säilitustingimustel täiendavalt analüüsida. Üksikute plasmade analüüsis 4 °C säilitustingimustel selgus nii valiini kui tauriini kontsentratsioonide muutustes ebastabiilsusi, mis ei ühtinud koondplasma tulemustega. Nende väljaselgitamiseks tuleks teostada suurema doonorite hulga stabiilsuse kordusuuringud, et püstitada analüüdi muutuste kohta hüpoteesid.

Magistritöös saadud informatsioon aitab tulevikus hinnata kliinilises töös saadavaid tulemusi, et kindlustada labori töövoos adekvaatsus ja toetada klinitsistide tööd, hoidudes valepositiivsete analüüsivastuste väljastamisest.

# **Evaluation of Metabolite Stability in Blood Plasma Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry**

Kaarina Kessel

## **Summary**

Metabolomics is one of the omics sciences, aiming to identify the set of biomolecules, metabolites, present in an organism, which best represent the molecular phenotype. The reproducibility of metabolites in samples can be influenced by various pre-analytical conditions. Numerous studies have been conducted to determine metabolite stability. According to the literature, storing plasma at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ensures the reproducibility of the metabolic profile, but higher temperatures may alter the concentrations of some analytes. In everyday clinical practice, the absence of the necessary equipment may prevent immediate storage at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The general aim of this master's thesis is to verify the literature data and compare them with the obtained results, determining suitable storage conditions for blood plasma for metabolic analysis. This experiment is a crucial foundation for developing metabolomics methods at the Tartu University Hospital's Clinic of Genetics and Personalized Medicine, with the eventual goal of applying these methods in clinical work. Therefore, the study assessed the metabolite content in donor plasma at various time points post-sampling, storing the plasma at three different temperatures. The results support the theory that some metabolites are unstable and require standardised pre-analytical processes, also serving as quality controls for pre-analytics.

The study found that most metabolites are stable under  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  storage conditions for short periods; only glutamate concentration changed at the second time point. Thus, the results align with literature data indicating that metabolic profiles of plasma stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for up to one week are reproducible. However, under  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  storage conditions, metabolite concentrations were more variable, and even one-week storage could affect analysis results. Some analytes remained stable throughout the study, confirming previously published data (Kamlage et al., 2014; Moriya et al., 2016). The experiment's results also matched literature data for analytes sensitive to storage temperature. These analytes can be considered quality markers indicating that the storage temperature was insufficient to prevent metabolic changes.

In positive ion mode, higher temperatures resulted in changes in the concentrations of some amino acids, a carnitine, a nucleoside, a carboxylic acid derivative, and a polyamine, which were compared with literature data. In negative ion mode, in addition to glutamate, changes in the concentrations of disaccharides were detected under  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  storage conditions, consistent with the literature. These analyte variations are useful as pre-analytical quality markers. Higher temperatures also resulted in changes in the concentrations of some amino acids, a fatty acid, and a B-group vitamin. Thus, the results align with literature data indicating that the metabolic profiles of plasma stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for up to one week are stable (Yin et al., 2013; Kamlage et al., 2014; Pinto et al., 2014; Haid et al., 2018). However, when stored at higher temperatures, metabolite concentrations change, making it impossible to accurately assess the analysis results.

Some analytes in the experiment, such as the serine amino acid derivative 2,3-diaminopropionate and the amino acids valine and taurine, showed stability issues that require further study. The results for the amino acid derivative in individual plasma samples showed a decreasing trend, but one sample decreased 2.5 times more than the others, affecting the pooled plasma results. Therefore, in future studies, the decrease in 2,3-diaminopropionate concentration at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  should be further analysed. In the analysis of individual plasmas stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , valine and taurine concentrations showed instabilities not reflected in the pooled plasma results. To clarify these findings, further stability studies with larger donor samples should be conducted to form hypotheses about analyte changes.

The information obtained in this master's thesis will help evaluate results in future clinical work, ensuring the adequacy of laboratory workflows and supporting clinicians' work by avoiding the issuance of false-positive analysis results.

## **Tänuõnad**

Soovin tänada enda põhijuhendajat Mihkel Ilissoni, tänu kellele sain tutvuda täiesti uudse meetodika arendusega. Aitäh ka mitmekülgse toetuse ja abi eest magistritöö teostamisel.

Samuti tänan SA TÜK Geneetika ja personaalmeditsiini kliiniku juhtkonda ja laboratoorse geneetika osakonna ainevahetushaiguste labori töötajaid, kes võimaldasid mul magistritöö eksperimenti teostada.

Tänan kõiki vabatahtlike doonoreid, kes uuringu jaoks verd loovutasid ja kaasjuhendajat Ants Kurge, kes aitas töö vormistamisel.

Minu eriline tänu kuulub abikaasale ja pojale.

## **Kasutatud kirjandus**

Ammerlaan, W., Trezzi, J.P., Lescuyer, P., Mathay, C., Hiller, K., Betsou, F. (2014) Method validation for preparing serum and plasma samples from human blood for downstream proteomic, metabolomic, and circulating nucleic acid-based applications. *Biopreserv. Biobank.* 12: 269–280.

Ang., J. E., Revell, V., Mann, A., Mäntele, S., Otway, D.T., Johnson, J.D., Thumser, A. E., Skene, D. J., Raynaud, F. (2012). Identification of Human Plasma Metabolites Exhibiting Time-of-Day Variation Using an Untargeted Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Metabolomic Approach. *The Journal of Biological and Medical Rhythm Research.* 29:7.

Alseekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y., ... Fernie, A. R. (2021). Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nature Methods* 18: 747-756.

Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57 (1), 289-300

Breier, M., Wahl, S., Prehn, C., ... Lechner, A. (2014). Targeted Metabolomics Identifies Reliable and Stable Metabolites in Human Serum and Plasma Samples. *Plos One* 9(2): e89728.

Blau, N., Vici, C. D., Ferreira, C. R., Vianey-Saban, C., van Karnebeek, C. D. M. 2014. *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases.* Springer International Publishing, Cham, Switzerland.

Carayol, M., Licaj, I., Achaintre, D., Sacerdote, C., Vines, P., Key, T. J., Moret, N. C. O., Scalbert, A., Rinaldi, S., Ferrari, P. (2015). Reliability of Serum Metabolites over a Two-Year Period: A Targeted Metabolomic Approach in Fasting and Non-Fasting Samples from EPIC. *PLoS ONE* 10(8): e0135437

Chetwynd, A. J., Dunn, W.B., Rodrigues-Blanco, G. 2017. Collection and Preparation of Clinical Samples for Metabolomics, p 19-44. In A. Sussulini (ed.), *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Application.* Springer International Publishing, Cham, Switzerland.

Coene, K. L., Kluijtmans, L. A. J., van der Heeft, E., ... Wevers, R. A. (2018). Next-generation metabolic screening: targeted and untargeted metabolomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in individual patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. Vol 41.

Dunn, W.B. (2011). Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*. 6: 1060-1083.

Fomenko, M. V., Yanshole, L.V., Tsentalovich, Y. P. 2022. Stability of Metabolomic Content during Sample Preparation: Blood and Brain Tissues. *Metabolites* 12: 1-16.

Haid, M., Muschet, C., Wahl, S., Römisch-Margl, W., Prehn, C., Möller, G., Adamski, J. (2018). Long-Term Stability of Human Plasma Metabolites during Storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . *Journal of proteome* 17: 203-211.

Hebels D.G.A. J., Georgiadis P., Keun H.C., ... Kyrtopoulos, S. A. (2013). Performance in omics analyses of blood samples in long-term storage: Opportunities for the exploitation of existing biobanks in environmental health research. *PMC* 121:480–487.

Imre, S., Vlase, L., Muntean, D. L. (2008). Bioanalytical method validation. *Revista Română de Medicină de Laborator*10(1): 13–21.

Johnson, C. H., Ivanisevic, J., Siuzdak, G. (2016). Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17: 451-459.

Kamlage, B., Gonzalez Maldonado, S., Bethan, B., Peter, E., Schmitz, O., Liebenberg, V., Schatz, P. (2014). Quality Markers Addressing Preanalytical Variations of Blood and Plasma Processing Identified by Broad and Targeted Metabolite Profiling. *Clinical Chemistry* 60:2 339-412.

Kumar, A., Bachhawat, A. K. (2012). Pyroglutamic acid: throwing light on a lightly studied metabolite. *Current Science*. 102(2): 288–297.

Lanpher, B., Brunetti-Pierri, N., Lee, B. (2006). Inborn errors of metabolism: the flux from Mendelian to complex diseases. *Nature Reviews Genetics*. 7: 449-459.

Leito, I. Viitak, A. 2007. Kvaliteeditagamine analüütilises keemias. Tallinna Tehnikaülikooli Kirjastus.

Marshall, W.J., Lapsley, M., Day, A., Ayling, R. 2014. Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects. Churchill Livingstone Elsevier. Edinburg, England.

Miller, J.N., Miller, J.C. 2010. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Pearson Education. Edinburg, England.

Moriya, T., Satomi, Y., Kobayashi, H. 2016. Intensive determination of storage condition effects on human plasma metabolomics. *Metabolomics*. 12: 179.

Nishiumi, S., Suzuki, M., Kobayashi, T., Yoshida, M. (2018). Differences in metabolite profiles caused by pre-analytical blood processing procedures. *Journal of bioscience and bioengineering*. 125(5): 613-618.

Rahman, M., Qureshi, R., Bruginski, E., Alazmi, M., Soufan, O., Biswas, K. H. Alam, T. 2023. Metabolomics of diabetes and cardiovascular disease , p. 239-256. In M. Rahman (ed.), *Metabolomics: A Path Towards Personalized Medicine*. Academic Press in an imprint of Elsevier, Oxford, United Kingdom.

Klassen, A., Faccio, A. T., Canuto, G. A. B., Rocha da Cruz, P. L., Riberio, H. C., Tavares, M. F. M., Sussulini, A. 2017. Metabolomics: Definitions and Significance in Systems Biology, p. 3-18. In Sussulini, A. (ed.), *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications*. Springer International Publishing, Cham, Switzerland.

Moriya, T.; Satomi, Y.; Kobayashi, H. (2016) Intensive determination of storage condition effects on human plasam metabolomics. *Metabolomics* 12: 179.

Oliver, S. G., Winson, M.K., Kell, D.B., Baganz, F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* 16:373-378.

Paglia, G., Del Greco, F. M., Sigurdsson, B. B., Rainer, J., Volani, C., Hicks, A. A., Pramstaller, P.P., Smarason, S.V. (2018). Influence of collection tubes during quantitative targeted metabolomics studies in human blood samples. *Clinica Chimica Acta*. 486: 320-328.

Pinto, J., Domingues, M. R. M., Galhano, E., Pita, C., Almeida, M. do C., Carreira, I. M., Gil, A. M. (2014). Human plasma stability during handling and storage: impact on NMR metabolomics. *The Analyst* 139(5): 1168–1177.

Sumner, L. W., Amberg, A., ... Viant, M. R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics*. 3(3): 211-221.

Zeleznik, O.A., Wittenbecher, C., Deik, A., ...Eliassen, A. H. (2022). Intrapersonal Stability of Plasma Metabolomic Profiles over 10 Years among Women. *Metabolites* 2022, 12(5), 372

Zhang Y., Lu H., Shen Y., Chen R., Fang P., Yu H., Wang C., Jia W. (2015). Analysis of reproducibility and variability from a frozen sample aliquotter by metabolomics analysis. *PMC*: 13:20–24.

Tautenhahn, R., Cho, K., Uritboonthai, W., Zhu, Z., Patti, G. J., Siuzdak, G. (2012). An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database. *Nature Biotechnology*. 30:826-828.

Tebani, A., Abily-Donval, L., Afonso, C., Marret, S., Bekri, S. (2016). Clinical Metabolomics: The New Metabolic Window for Inborn Errors of Metabolism Investigations in the Post-Genomic Era. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(7): 1167.

Thompson, D.K.; Sloane, R.; Bain, J.R.; Stevens, R.D.; Newgard, C.B.; Pieper, C.F.; Kraus, V.B. (2012) Daily variation of serum acylcarnitines and amino acids. *Metabolomics* 8, 556–565.

Townsend, M. K., Clish, C. B., Kraft, P., Wu, C., Souza, A. L., Deik, A. A., Tworoger, S.S., Wolpin, B. M. (2013). Reproducibility of Metabolomic Profiles among Men and Women in 2 Large Cohort Studies. *Clinical Chemistry* 59(1), 1657–1667.

Townsend, M.K., Bao, Y., Poole, E.M., Bertrand, K.A., Kraft, P., Wolpin, B.M., Clish, C.B., Tworoger, S. S. (2016). Impact of Pre-analytic Blood Sample Collection Factors on Metabolomics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 25 (5): 823–829.

Valo, E., Colombo, M., Sanholm, N., ... Dalton, R. N. (2022). Effect of serum sample storage temperature on metabolomic and proteomic biomarkers. *Scientific Reports* 12:4571.

Wagner-Golbs, A., Neuber, S., Kamlage, B., Bethan, N.B.B., Rennefahrt, U., Schatz, P., Lind, L. (2019). Effects of Long-Term Storage at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  on the Human Plasma Metabolome. *Metabolomics* 9(5), 99.

Wikoff, W. R., Gangoiti, J. A., Barshop, B., A., Siuzdak, G. 2007. Metabolomics Identifies Perturbations in Human Disorders of Propionate Metabolism, p. 2169-2176. In *Clinical Chemistry*, Vol. 53. Oxford University Press. United Kingdom.

Yanes, O., Salek, R., Marin de Mas, I., Cascante M. 2020. Overview of Metabolomics, p. 1-14. In Wehrens, R., Salek, R. (ed.), *Metabolomics: Practical Guide to Design and Analysis*. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida.

Yang, W., Chen, Y., Xi, C., Zhang, R., Song, Y., Zhan, Q., Bi, X., Abliz, Z. (2013). Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry-Based Plasma Metabonomics Delineate the Effect of Metabolites' Stability on Reliability of Potential Biomarkers. *Analytical Chemistry* 85(5): 2606–2610.

Yin, P., Peter, A., ... Lehmann, R. (2013). Preanalytical Aspects and Sample Quality Assessment in Metabolomics Studies of Human Blood. *Clinical Chemistry.* 59(5): 833-845.

Yu, Z., Kastenmüller, G., He, Y., ... Wang-Sattler, R. (2011). Differences between Human Plasma and Serum Metabolite Profiles. *Plosone* 6:7

## **Kasutatud veebiaadressid**

Iroatech - Iroa Technologies -

<https://www.iroatech.com/iroa-yeast-internal-standard-qc-workflow-kit/> (17.05.2024)

Mayoclinic, Mayo Foundation for Medical Education and Research.

<https://www.mayoclinic.org/> (20.05.2024)

Z-4: Mean, Standard Deviation, And Coefficient Of Variation. (1999). Westgard QC.

<https://www.westgard.com/lesson34.htm> (06.05.2024)

## Lisad

### Lisa 1. Tulemused.

**Tabel 14.** Positiivse ioonirežiimi analüüdid ja mõõdetulemused.

Aine	Valem	Mass	Retensiooni-aeg	Aineklass	Sobivaim sisestandard	Standardiseerimata CV	Standardiseeritud CV	Muutus -20 °C juures	Muutus 4 °C juures
Türosiin	$C_9H_{11}NO_3$	181,074	2,33	Aminohape	Phe-IS	5,4%	1,0%	Stabiilne	Stabiilne
Trüptofaan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	204,0899	4,98	Aminohape	Phe-IS	3,7%	1,8%	Stabiilne	Stabiilne
Trigonelliin	$C_7H_7NO_2$	137,0477	0,78	Karboksüülhape	Phe-IS	6,4%	2,8%	Stabiilne	Stabiilne
Trans-4-hüdroksü-L-Proliin	$C_5H_9NO_3$	131,0583	0,69	Aminohape	Creatine-IS	7,6%	5,9%	Stabiilne	Stabiilne
Teofülliin	$C_5H_9NO_3$	180,0648	5,46	Aminohape	Carnitine-IS	1,8%	1,1%	Stabiilne	Stabiilne
Tauriin	$C_2H_7NO_3S$	125,0146	0,67	Aminohape	DDPC-IS	4,5%	2,4%	Stabiilne	↑
Spermidiin	$C_7H_{19}N_3$	145,158	0,52	Polüamiin	Creatine-IS	14,4%	12,4%	—	—
Serotoniin	$C_{10}H_{12}N_2O$	176,095	3,04	Polüamiin	Carnitine-IS	2,1%	1,8%	↑	Stabiilne

Seriin	$C_3H_7NO_3$	105,0426	0,67	Aminohape	Hippuric acid-IS	13,4%	11,5%	—	—
Putresiin	$C_4H_{12}N_2$	88,1	0,58	Polüamiin	Nicotinamide-IS	7,4%	6,7%	Stabiilne	↓
Proliin	$C_5H_9NO_2$	115,0634	0,79	Aminohape	Phe-IS	6,8%	2,5%	Stabiilne	Stabiilne
Fenüülalaniin	$C_9H_{11}NO_2$	165,0791	3,79	Aminohape	Phe-IS	4,3%	1,0%	Stabiilne	Stabiilne
Paraksantiin	$C_7H_8N_4O_2$	180,0648	5,27	Puriin	DDPC-IS	3,1%	4,2%	Stabiilne	Stabiilne
Panteonaat	$C_7H_8N_4O_2$	219,1106	4,48	Vitamiin	Nicotinamide-IS	7,0%	7,1%	Stabiilne	Stabiilne
<i>O</i> -atsetüül-karnitiin	$C_9H_{17}NO_4$	203,1159	1,1	Karnitiin	Nicotinamide-IS	4,8%	3,1%	Stabiilne	Stabiilne
<i>N,N</i> -Dimetüül-arginiin	$C_8H_{18}N_4O_2$	202,1429	0,78	Aminohappe derivaat	DDPC-IS	3,1%	1,6%	Stabiilne	Stabiilne
<i>N,N,N</i> -Trimetüül-lüsiin	$C_9H_{20}N_2O_2$	188,1523	0,66	Aminohappe derivaat	Nicotinamide-IS	4,3%	4,1%	Stabiilne	Stabiilne
Metüül-4-amino-butüraat	$C_5H_{11}NO_2$	117,0791	1,07	Aminohape	Phe-IS	4,6%	1,2%	Stabiilne	Stabiilne
Metioniin	$C_5H_{11}NO_2S$	149,0511	1,29	Aminohape	Val-IS	6,6%	1,1%	Stabiilne	Stabiilne
Lüsiin	$C_6H_{14}N_2O_2$	146,1054	0,58	Aminohape	Nicotinamide-IS	5,6%	3,9%	Stabiilne	Stabiilne
L-ornitiin	$C_5H_{12}N_2O_2$	132,0898	0,58	Aminohape	Nicotinamide	5,9%	6,1%	Stabiilne	↑

					-IS				
Leutsiin	$C_6H_{13}NO_2$	131,0948	2,44	Aminohape	Phe-IS	3,8%	2,1%	Stabiilne	Stabiilne
L-karnitiin	$C_7H_{15}NO_3$	161,1054	0,7	Karnitiin	Carnitine-IS	2,1%	0,7%	Stabiilne	Stabiilne
Lauroül-karnitiin	$C_{19}H_{37}NO_4$	343,2722	12,62	Karnitiin	Val-IS	10,6%	7,2%	Stabiilne	Stabiilne
L-alaniin	$C_3H_7NO_2$	89,0476	0,68	Aminohape	DDPC-IS	1,9%	1,8%	Stabiilne	↑
Disahhariidid	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342,116	0,71	Disahhariid	Nicotinamide-IS	6,3%	5,9%	Stabiilne	Stabiilne
Küureniin	$C_{10}H_{12}N_2O_3$	208,0847	3,44	Aminohape derivaat	Val-IS	6,5%	4,1%	Stabiilne	Stabiilne
Isoleutsiin	$C_6H_{13}NO_2$	131,0948	2,28	Aminohape	Phe-IS	4,6%	1,0%	Stabiilne	Stabiilne
Inosiin	$C_{10}H_{12}N_4O_5$	268,0806	3,23	Nukleotiid	DDPC-IS	11,5%	10,5%	—	—
Hüpoksantiin	$C_5H_4N_4O$	136,0386	1,68	Puriin	Carnitine-IS	1,0%	1,1%	Stabiilne	Stabiilne
Histidiin	$C_6H_9N_3O_2$	155,0694	0,68	Aminohape	Val-IS	4,1%	4,3%	Stabiilne	Stabiilne
Hipuraat	$C_9H_9NO_3$	179,0582	5,88	Karboksüülhape	DDPC-IS	5,2%	3,1%	Stabiilne	Stabiilne
Glükohenodeo-ksükolaat	$C_{26}H_{43}NO_5$	449,3144	14,42	Sapphape	Hippuric acid-IS	7,8%	7,0%	Stabiilne	Stabiilne
Glutarüül-karnitiin	$C_{12}H_{21}NO_6$	275,1369	2,85	Karnitiin	Creatine-IS	3,2%	1,9%	Stabiilne	↓

Glutamiin	$C_5H_{10}N_2O_3$	146,0692	0,68	Aminohape	Carnitine-IS	1,2%	1,7%	Stabiilne	↓
Gamma-aminobutüraat	$C_4H_9NO_2$	103,0633	0,69	Aminohape	Nicotinamide-IS	3,7%	3,9%	Stabiilne	Stabiilne
Dihürouratsiil	$C_4H_6N_2O_2$	114,0431	0,77	Pürimidiin	Creatine-IS	3,2%	1,2%	Stabiilne	Stabiilne
Deoksü-karnitiin	$C_7H_{15}NO_2$	145,1103	0,76	Karnitiin	Phe-IS	7,0%	2,9%	Stabiilne	Stabiilne
Kreatiniin	$C_4H_7N_3O$	113,0591	0,74	Lämmastiku ühend	Creatine-IS	4,9%	2,7%	Stabiilne	Stabiilne
Kreatiin	$C_4H_9N_3O_2$	131,0696	0,76	Aminohappe derivaat	Creatine-IS	3,2%	1,1%	Stabiilne	Stabiilne
Tsitruulliin	$C_6H_{13}N_3O_3$	175,0957	0,67	Aminohape	Carnitine-IS	2,0%	2,0%	Stabiilne	Stabiilne
Koffeiin	$C_8H_{10}N_4O_2$	194,0804	6,36	Puriin	Carnitine-IS	2,2%	1,8%	Stabiilne	Stabiilne
Kadaveriin	$C_5H_{14}N_2$	102,1156	0,57	Amiin	Nicotinamide-IS	5,7%	4,9%	Stabiilne	Stabiilne
Betaiin	$C_5H_{11}NO_2$	117,0791	0,72	Aminohappe derivaat	Carnitine-IS	2,5%	1,5%	Stabiilne	Stabiilne
Asparagiin	$C_4H_8N_2O_3$	132,0535	0,67	Aminohape	DDPC-IS	7,1%	6,6%	Stabiilne	↓
Arginiin	$C_6H_{14}N_4O_2$	174,1116	0,66	Aminohape	Creatine-IS	3,0%	2,3%	Stabiilne	Stabiilne
Heksoosid	$C_6H_{12}O_6$	180,0633	0,7	Mono-sahhariid	DDPC-IS	4,3%	4,9%	Stabiilne	Stabiilne
Treoniin	$C_4H_9NO_3$	119,0583	0,69	Aminohape	Nicotinamide	6,8%	4,9%	Stabiilne	Stabiilne

					-IS				
Atseetoatsetaat	$C_4H_6O_3$	102,0316	1,09	Ketoon	Nicotinamide -IS	12,0%	10,8%	—	—
4-atseet- amido- butanoaat	$C_6H_{11}NO_3$	145,074	2,98	Karboksüül- happe derivaat	DDPC-IS	4,7%	4,9%	Stabiilne	Stabiilne
1-metüül- nikotiinamiid	$C_7H_9N_2O$	137,0712	0,81	Amiid	Hippuric acid-IS	7,0%	4,1%	Stabiilne	Stabiilne
Metüül- histidiin	$C_7H_{11}N_3O_2$	169,0852	0,68	Aminohappe derivaat	Nicotinamide -IS	7,4%	5,8%	Stabiilne	Stabiilne
Metüül- adenosiin	$C_{11}H_{15}N_5O_4$	281,1124	1,91	Nukleosiid	Nicotinamide -IS	9,4%	8,1%	Stabiilne	↓
1-amino- tsüklo- propan- karboksülaad	$C_4H_7NO_2$	101,0477	0,68	Aminohappe derivaat	Nicotinamide -IS	4,8%	3,3%	Stabiilne	↓

**Tabel 15.** Negatiivse ioonirežiimi analüüdid ja mõtetulemused.

Aine	Valem	Mass	Retensiooni -aeg	Aineklass	Sobivaim sisestan- dard	Stan- dardi- seeri- mata CV	Stan- dardi- seeritud CV	Muutus -20 °C juures	Muutus 4 °C juures
Türoksiin	$C_{15}H_{11}I_4NO_4$	776,6861	12,23	Hormoon	Hippuric acid-IS	9,9%	8,3%	Stabiilne	Stabiilne
Glükolaat	$C_{26}H_{43}NO_6$	465,3087	13,92	Sapphape	Uric-acid-IS	6,1%	4,5%	Stabiilne	Stabiilne
Glükoheno- deoksükolaat	$C_{26}H_{43}NO_5$	449,3139	14,88	Sapphape	Phe-IS	3,1%	4,8%	Stabiilne	Stabiilne
Kolaat	$C_{24}H_{40}O_5$	408,2873	14,41	Sapphape	Hippuric acid-IS	26,8%	26,5%	—	—
Kortisool	$C_{21}H_{30}O_5$	362,209	11	Steroid	Hippuric acid-IS	6,3%	3,2%	Stabiilne	Stabiilne
Disahhariidid	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342,1161	0,78	Disahhariid	Hippuric acid-IS	5,3%	6,3%	↑	↑
<i>N</i> -atsetüül- neuraminülaat	$C_{11}H_{19}NO_9$	309,1057	0,83	Monosahhariid	Uric-acid-IS	10,1%	11,5%	—	—
Gamma- linolenaat	$C_{18}H_{30}O_2$	278,2247	16,17	Rasvhape	Uric-acid-IS	4,6%	2,2%	Stabiilne	↑
Uridiin	$C_9H_{12}N_2O_6$	244,0699	2,34	Nukleosiid	Hippuric acid-IS	4,7%	2,9%	Stabiilne	Stabiilne
Pantoteenhape	$C_9H_{17}NO_5$	219,1106	4,43	Vitamiin	Phe-IS	6,7%	9,0%	Stabiilne	Stabiilne

Indoksüül sulfaat	$C_8H_7NO_4S$	213,0095	6,96	Aminohappe derivaat	Uric-acid-IS	11,3%	12,6%	—	—
Kinureniin	$C_{10}H_{12}N_2O_3$	208,0847	3,15	Aminohappe derivaat	Phe-IS	3,7%	6,0%	Stabiilne	Stabiilne
Trüptofaan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	204,0899	4,4	Aminohape	Phe-IS	2,3%	2,6%	Stabiilne	Stabiilne
Kiniinhape	$C_7H_{12}O_6$	192,0634	0,82	Karboksüülhape	Phe-IS	8,9%	6,5%	Stabiilne	Stabiilne
Hüdroksüfenüüllaktaat	$C_9H_{10}O_4$	182,0579	5	Fenool	Hippuric acid-IS	4,9%	3,9%	Stabiilne	Stabiilne
Türosiin	$C_9H_{11}NO_3$	181,074	1,63	Aminohape	Uric-acid-IS	2,7%	2,4%	Stabiilne	Stabiilne
Teofülliin	$C_7H_8N_4O_2$	180,0649	5,41	Puriin	Phe-IS	1,9%	2,4%	Stabiilne	Stabiilne
Paraksantiin	$C_7H_8N_4O_2$	180,0648	5,22	Puriin	Phe-IS	5,2%	5,5%	Stabiilne	Stabiilne
Heksoosid	$C_6H_{12}O_6$	180,0635	0,72	Monosahhariid	Uric-acid-IS	5,9%	2,1%	Stabiilne	Stabiilne
Hippuraat	$C_9H_9NO_3$	179,0583	6,03	Karboksüülhape	Hippuric acid-IS	4,4%	2,2%	Stabiilne	Stabiilne
D-glükoronolaktoon	$C_6H_8O_6$	176,033	0,7	Laktoon	Val-IS	33,5%	28,1%	—	—
Tsitruilliin	$C_6H_{13}N_3O_3$	175,096	0,71	Aminohape	Hippuric acid-IS	7,9%	4,3%	Stabiilne	Stabiilne
Indool-3-atsetaat	$C_{10}H_9NO_2$	175,0634	8,33	Aminohappe derivaat	Phe-IS	14,1%	10,9%	—	—

Arginiin	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	174,1119	0,68	Aminohape	Hippuric acid-IS	7,6%	5,3%	Stabiilne	Stabiilne
Püridoksaal	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	167,0581	1,09	Vitamiin	Hippuric acid-IS	7,3%	6,8%	Stabiilne	↑
Fenüülalaniin	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	165,0791	3,42	Aminohape	Phe-IS	2,3%	2,6%	Stabiilne	Stabiilne
Deoksüheksoosid	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	164,0685	0,82	Monosahhariid	Phe-IS	7,4%	8,8%	Stabiilne	Stabiilne
Histidiin	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	155,0696	0,68	Aminohape	Uric-acid-IS	4,5%	5,6%	Stabiilne	Stabiilne
Pentitoolid	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	152,0686	0,78	Monosahhariidi derivaat	Phe-IS	16,4%	17,1%	—	—
Pentoosid	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	150,0529	0,82	Monosahhariid	Uric-acid-IS	15,4%	14,1%	—	—
Metioniin	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	149,0514	1,09	Aminohape	Uric-acid-IS	6,4%	3,2%	Stabiilne	Stabiilne
<i>N</i> -atsetüülseriin	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	147,0533	1,1	Aminohappe derivaat	Hippuric acid-IS	6,3%	4,7%	Stabiilne	Stabiilne
Glutamaat	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	147,0534	0,7	Aminohape	Uric-acid-IS	7,2%	6,1%	↑	↑
Glutamiin	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	146,0694	0,69	Aminohape	Phe-IS	0,9%	3,5%	Stabiilne	↓
Hüpoksantiin	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O	136,0385	1,78	Puriin	Phe-IS	8,8%	7,2%	Stabiilne	Stabiilne
Asparagiin	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	132,0536	0,68	Aminohape	Phe-IS	3,3%	5,8%	Stabiilne	↓
Isoleutsiin	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131,0947	1,59	Aminohape	Uric-acid-IS	3,8%	3,0%	Stabiilne	Stabiilne

Leutsiin	$C_6H_{13}NO_2$	131,0948	1,73	Aminohape	Phe-IS	2,7%	2,6%	Stabiilne	Stabiilne
Hüdroksüproliin	$C_5H_9NO_3$	131,0584	0,69	Aminohappe derivaat	Phe-IS	22,6%	24,6%	—	—
<i>N</i> -atsetüülalaniin	$C_5H_9NO_3$	131,0583	2,23	Aminohappe derivaat	Uric-acid-IS	19,7%	19,4%	—	—
Ketoleutsiin	$C_6H_{10}O_3$	130,063	6,94	Ketohape	Uric-acid-IS	4,0%	2,0%	Stabiilne	Stabiilne
Pipekolaat	$C_6H_{11}NO_2$	129,0793	1,09	Aminohappe derivaat	Uric-acid-IS	12,6%	13,2%	—	—
Oksoproliin	$C_5H_7NO_3$	129,0427	1,55	Aminohappe derivaat	Hippuric acid-IS	4,8%	3,7%	Stabiilne	↑
Tauriin	$C_2H_7NO_3S$	125,0149	0,69	Aminohape	Phe-IS	1,9%	3,7%	Stabiilne	↑
Valiin	$C_5H_{11}NO_2$	117,0791	0,89	Aminohape	Val-IS	17,9%	3,1%	Stabiilne	↑
Proliin	$C_5H_9NO_2$	115,0634	0,83	Aminohape	Uric-acid-IS	5,7%	5,3%	Stabiilne	Stabiilne
Kreatiniin	$C_4H_7N_3O$	113,059	0,67	Lämmastikühend	Phe-IS	4,1%	4,7%	Stabiilne	Stabiilne
Bensüülamiin	$C_7H_9N$	107,0736	6,03	Amiin	Hippuric acid-IS	5,8%	5,7%	Stabiilne	Stabiilne
2,3-diaminopropionaat	$C_3H_8N_2O_2$	104,0588	0,69	Aminohappe derivaat	Phe-IS	1,1%	3,6%	Stabiilne	↓
2-hüdroksübutüraat	$C_4H_8O_3$	104,0473	2,46	Karboksüülhapete derivaat	Uric-acid-IS	14,5%	13,1%	—	—

L-Alaniin	$C_3H_7NO_2$	89,0478	0,69	Aminohape	Phe-IS	13,4%	11,9%	—	—
Glütsiin	$C_2H_5NO_2$	75,032	0,69	Aminohape	Phe-IS	17,5%	19,2%	—	—

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Kaarina Kessel,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “Metaboliitide stabiilsuse hindamine vereplasmas vedelikkromatograafia-massispektromeetria meetodil”,

mille juhendajad on PhD Mihkel Ilisson ja professor Ants Kurg,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Kaarina Kessel*  
**30.05.2024**