

**Aineenvaihduntareittien fluksomiikan analysointi lihassoluista
UHPLC-MS-menetelmällä**

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

31.7.2024

Roosa-Maria Liimatainen

Tiivistelmä

Tämän Pro gradu -tutkimuksen kirjallisessa osassa perehdytään pintaa syvemmälle solujen metabolomiikkaan sekä fluksomiikkaan. Kirjallisen osan alussa käsitellään solujen toimintaa perustasolla ja käydään läpi tutkimuksen osalta tärkeimpiä aineenvaihduntareittejä ja niiden tuottamia aineenvaihduntatuotteita eli metaboliitteja. Tämän jälkeen kirjallinen osa keskittyy käsittelemään fluksomiikkaa syvemmällä tasolla ja sitä, kuinka isotooppileimaus on isossa roolissa sen tutkimuksessa. Näiden edellä mainittujen aiheiden lisäksi kirjallisessa osassa käsitellään nykypäivänä metabolomiikan ja fluksomiikan tutkimuksessa yleisimmin käytettyjä analyysimenetelmiä, kuten massaspektrometriaa, nestekromatografiaa, ydinmagneettista resonanssispektroskopiaa sekä kaasukromatografiaa. Kirjallisen osan loppupuolella käsitellään tutkimuksessa keskeisessä roolissa olevia analyysimenetelmien yhdistelmiä, kuten LC-MS- ja GC-MS-analytiikkaa.

Kokeellisen osan tarkoituksena oli perehtyä ihmisen sekä hiiren lihassolunäytteiden soluviljelyyn, näytteiden keräykseen sekä näytteiden analysointiin UHPLC-QQQ-MS-laitteistoa hyödyntäen. Tutkimuksessa perehdyttiin syvemmin, kuinka lihassolujen aineenvaihduntareitit tuottavat tiettyjä kiinnostuksen kohteena olevia aminohappoja sekä kuinka nopeasti ne tuottavat niitä tietyissä aikapisteissä. Näytteiden analysoinnin osalta tutkimuksessa keskityttiin ensin optimoimaan UHPLC-MS/MS-menetelmää kuoppatestin sekä aikapistevertailun avulla. Kun menetelmä oli saatu optimoitua mittauksiin sopivaksi, analysoitiin ihmisen lihassolunäytteistä aineenvaihduntareittien virtausnopeutta eli fluksomiikkaa. Fluksomiikan tutkimisessa hyödynnettiin isotooppileimausta, jossa ihmisen lihassolujen annettiin vaikuttaa ¹³C-isotooppileimatun glukoosiliuoksen kanssa eri aikapisteiden verran. Isotooppileimattuja glukoosiliuoksia valmistettiin kokeellista osaa varten kahta erilaista, joissa niiden pitoisuudet säädettiin HS (*horse serum*) - ja FBS (*fetal bovine serum*) -seerumien avulla 2 ja 20 prosenttiseksi. Eri seerumipitoisten glukoosiliuosten tarkoituksena oli stimuloida ihmisen lihassolujen aineenvaihduntareittejä ja tarkoituksena oli analysoida, onko isotooppileimatun glukoosiliuoksen väkevyydellä merkittävää vaikutusta aminohappojen tuotantoon.

Esipuhe

Tutkimus suoritettiin yhteistyössä liikuntatieteellisen tiedekunnan kanssa ja sen kokeellinen osa suoritettiin kevään 2024 aikana. Tutkimus rajattiin keskittymään fluksomiikan tutkimukseen ihmisen lihassolunäytteistä hyödyntäen UHPLC-MS analytiikkaa. Tutkimuksessa perehdyttiin soluviljelyn saloihin sekä menetelmän kehitykseen ja analyysien suorittamiseen UHPLC-MS-laitteistolla. Tutkielmassa käytetty lähdekirjallisuus haettiin pääosin sähköisten tietokantojen avulla. Työnohjaajinani toimivat kemian laitokselta Elina Kalenius sekä liikuntatieteellisestä tiedekunnasta Sakari Mäntyselkä.

Haluan osoittaa kiitokseni ohjaajalleni Elina Kaleniukselle mahdollisuudesta toteuttaa tutkielma yhteistyössä liikuntatieteellisen tiedekunnan kanssa sekä laadukkaasta ohjauksesta ja kärsivällisyydestä koko matkan ajan. Lisäksi haluan kiittää väitöskirjatutkijaa Sakari Mäntyselkää hyvästä sekä laadukkaasta ohjauksesta tutkimuksen kokeellisen osan toteutuksessa. Erityiskiitokset haluan osoittaa opiskelukavereilleni, ystäväilleni ja läheisilleni, motivoinnista sekä tuesta läpi koko maisteritutkinnon ja etenkin pro-gradu -tutkielman ajan.

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	i
Esipuhe	ii
Sisällysluettelo	iii
Käytetyt lyhenteet	v
<u>KIRJALLINEN OSA</u>	<u>1</u>
1. Johdanto	1
2. Metabolia	2
2.1 Katabolia	3
2.1.1 Solun energiantuottoreitit	4
2.1.2 Glykolyysi	5
2.1.3 Anaerobinen ja aerobinen energiantuotanto	8
2.2 Anabolia	11
3. Fluksomiikka	14
3.1 Aineenvaihdunta ja isotooppijäljitys	14
3.2 ¹³ C-isotooppileimatun glukoosin päätyminen aminohappoihin	16
4. Fluksomiikan tutkimuksen analyttiset menetelmät	18
4.1 Massaspektrometria yleisesti	19
4.1.1 Ionisaatiomenetelmät	20
4.1.1.1 Sähkösumutus-ionisaatio (ESI)	21
4.1.1.2 Elektroni-ionisaatio (EI)	22
4.1.1.3 Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio (MALDI)	23
4.1.2 Massa-analysaattorit	24
4.1.2.1 Lentoaikamassa-analysaattori (TOF)	26
4.1.2.2 Kvadrupolimassa-analysaattori (Q)	28
4.1.2.3 Orbitrap-massa-analysaattori	31
4.1.3 Detektorit	33
4.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia-massaspektrometria (HPLC-MS)	33
4.3 Kaasukromatografia-massaspektrometria (GC-MS)	36
4.4 Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia (NMR)	38

KOKEELLINEN OSA	41
5. Työn tarkoitus	41
6. Näytteiden ja liuosten valmistus	41
6.1. Kasvatus- ja erilaistusmediumien valmistus	41
6.2. Soluviljelmien ylläpito	43
6.3. Näytteiden valmistus	46
6.4. Puskuriliuosten valmistus	48
7. Käytetyt laitteet ja menetelmät	49
8. Tulokset ja johtopäätökset	52
8.1. Puskuriliuosten konsentraation optimointi	54
8.2. Menetelmän muokkaus UHPLC-QQQ-MS laitteistolle	55
8.2.1 Aikapistevertailu	56
8.2.2 Kuoppatesti	60
8.3. Ihmisen lihassolunäytteiden analysointi	63
8.3.1 Testinäytteet ja menetelmän optimointi	64
8.3.2 Aikapistevertailu	65
8.3.3 Seerumin vaikutus mittaustuloksiin	69
8.3.4 Aminohappojen isotopologien runsaus	71
9. Yhteenveto	73
10. Kirjallisuusluettelo	76
11. Liitteet	80

Käytetyt lyhenteet

Lyhenne	Suomeksi	Englanniksi
Asetyyli-KoA	Asetyylikoentsyymi-A	<i>Acetyl coenzyme A</i>
ATP	Adenosiinitrifosfaatti	<i>Adenosine triphosphate</i>
ADP	Adenosiinidifosfaatti	<i>Adenosine diphosphate</i>
NADH	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
GDP	Guanosiinidifosfaatti	<i>Guanocine biphosphate</i>
GTP	Guanosiinitrifosfaatti	<i>Guanocine triphosphate</i>
G6P	Glukoosi-6-fosfaatti	<i>Glucose-6-phosphate</i>
F6P	Fruktoosi-6-fosfaatti	<i>Fructose 6-phosphate</i>
PPP	Pentoosifosfaattireitti	<i>Pentose phosphate pathway</i>
NMR	Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia	<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>
MS	Massaspektrometria	<i>Massspectrometry</i>
CLE	Hiilimerkintäko	<i>Carbon labelling experiment</i>
GC-MS	Kaasukromatografia – massaspektrometria	<i>Gas chromatography – mass spectrometry</i>
HPLC-MS	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia – massaspektrometria	<i>High performance liquid chromatography – mass spectrometry</i>
EI-MS	Elektroni-ionisaatio – massaspektrometria	<i>Electron ionization – mass spectrometry</i>
ESI-MS	Sähkösumutusionisaatio – massaspektrometria	<i>Electrospray ionization – mass spectrometry</i>
ESI	Sähkösumutusionisaatio	<i>Electrospray ionization</i>
MALDI	Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio	<i>Matrix-assisted laser Desorption ionization</i>
EI	Elektroni-ionisaatio	<i>Electron ionization</i>
CI	Kemiallinen ionisaatio	<i>Chemical ionization</i>
FI	Kenttäionisaatio	<i>Field ionization</i>
FD	Kenttädesorptio	<i>Field desorption</i>
DESI	Desorptiosähkösumutusionisaatio	<i>Desorption electrospray ionization</i>

APCI	Ilmanpaineessa tapahtuva kemiallinen ionisaatio	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
TOF	Lentoaika	<i>Time of flight</i>
IT	Ioniloukku	<i>Ion trap</i>
FTICR	Fouriermuunnosionisyklotroniresonanssi	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>
QTOF	kvadrupolilentoaika	
Q	Kvadrupoli	<i>Quadrupole</i>
DC	Tasavirta	<i>Direct current</i>
AC	Vaihtovirta	<i>Alternating current</i>
QQQ	Kolmoiskvadrupoli	<i>Triple quadrupole</i>
UHPLC	Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia	<i>Ultra-high performance liquid chromatography</i>
UHPLC -QQQ-MS	Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia – kolmoiskvadrupoli massaspektrometria	<i>Ultra-high performance liquid chromatography – triple quadrupole mass spectrometry</i>
UHPLC- QTOF-MS	Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia – kvadrupolilentoaika massaspektrometria	<i>Ultra-high performance liquid chromatography – quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i>
RT	Retentioaika	<i>Retention time</i>
GM	Kasvatusmedium, kasvatusliuos	<i>Growth medium</i>
DM	Erilaistusmedium, erilaistusliuos	<i>Differentiation medium</i>
DMEM		<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
FBS		<i>Fetal bovine serum</i>
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos	<i>Phosphate buffered saline</i>
ACN	Asetonitrili	<i>Acetonitrile</i>
QC	Laadunvarmistusnäyte	<i>Quality control</i>
RPLC	Käänteisfaasinestekromatografia	<i>Reversed-phase liquid chromatography</i>
NPLC	Normaalifaasinestekromatografia	<i>Normal phase liquid chromatography</i>

KIRJALLINEN OSA

1. Johdanto

Metabolomiikka on ”omiikan” yksi tieteen haaroista, jonka tarkoituksena on analysoida biologisista näytteistä metaboliitteja (koko luokkaa < 10 kDa), kuten esimerkiksi hiilihydraatteja ja aminohappoja. Metabolomiikan tutkimusta tehdään monella eri tieteen osa-alueella, joista esimerkkeinä muun muassa kasvimetabolomiikan tutkimus, tutkimus kliinisessä diagnostiikassa sekä tutkimus liikuntafysiologiassa. Kuitenkin tässä pro gradu-tutkimuksessa keskitytään tarkastelemaan metabolomiikkaa liikuntafysiologian ja etenkin fyysisen aktiivisuuden näkökulmasta, kun perehdytään tutkimaan aminohappojen eli metaboliittien aineenvaihduntaa hiiren sekä ihmisen lihassoluissa. Näitä metaboliitteja tutkimalla voidaan karakterisoida aineenvaihdunnan eroja ryhmien sekä yksilöiden välillä. Metabolomiikan tutkimuksessa hyödynnetään paljon kemiallisia analyysimenetelmiä aineenvaihduntatuotteiden analysoimiseen, kuten massaspektrometriaa (MS, *mass spectrometry*) ja ydinmagneettista resonanssispektroskopiaa (NMR, *nuclear magnetic resonance spectroscopy*). Analyysimenetelmien isoimpana tavoitteena on tuottaa kvantitatiivisia sekä kvalitatiivisia mittaustuloksia aineenvaihduntatuotteista. Metabolomiikan tutkimus, liikuntafysiologian näkökulmasta, keskittyy tutkimaan muutoksia soluissa sekä kehossa, harjoituksen aikana ja sen jälkeen, sekä se auttaa ymmärtämään fyysisen aktiivisuuden vaikutusta terveyteen. Jotta voidaan ymmärtää harjoitusten vaikutusta ihmisen terveyteen molekyyl- ja solutasolla, voidaan analysoinnissa hyödyntää kemian analytiikkaa, kuten edellä mainittua massaspektrometriaa. Massaspektrometrin avulla voidaan käyttää kohdennettuja tai kohdentamattomia metabolomiikan menetelmiä analysoidessa fyysistä aktiivisuutta ja sen vaikutusta terveyteen.^{1,2}

Metabolomiikan lisäksi tutkimusta on tehty viime vuosikymmenten aikana myös fluksomiikan osalta. Fluksomiikka, metabolomiikan tapaan, keskittyy solujen aineenvaihduntaan, mutta se tutkii astetta tarkemmin solujen aineenvaihduntareittien virtausta eli niin kutsuttua fluxia (eng. flux). Fluksomiikan avulla voidaan tutkia valtava määrä erilaisia reaktioita soluissa, kuten anabolisia ja katabolisia reaktioita sekä metaboliittien virtausta soluihin sisälle ja sieltä ulos. Fluksomiikan tutkimuksessa hyödynnetään suurelta osin isotooppiäljitystä, jonka avulla

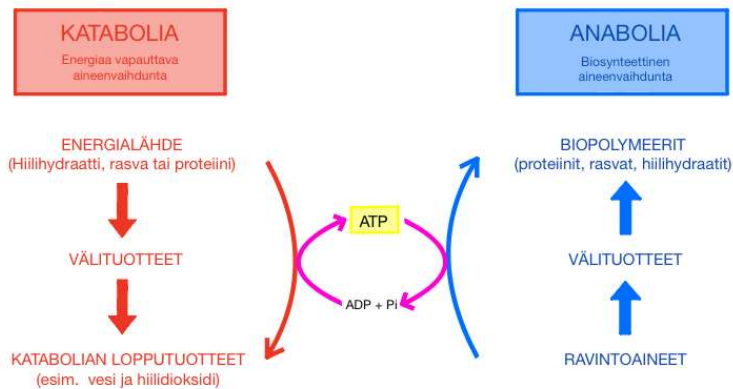
voidaan seurata solujen aineenvaihduntareittien käyttäytymistä sekä toimintaa. Fluksomiikan tutkimusta on tehty kemian osa-alueella yhä enenevässä määrin viimeisten vuosikymmenten ajan ja sen tutkimuksessa on hyödynnetty paljon massaspektrometriisiä menetelmiä, kuten Korkean erotuskyvyn nestekromatografia – massaspektrometriaa (HPLC-MS, *high performance liquid chromatography – mass spectrometry*).³

Tämän pro gradu -tutkielman tarkoituksena oli perehtyä syvemmin kemian analyttisiin menetelmiin ja tutkia fluksomiikkaa ihmisen lihassolunäytteistä ¹³C-isotooppijäljityksen avulla. Tutkimuksessa tutustuttiin tarkemmin ihmisen lihassolujen soluviljelyyn ja siihen, kuinka lihassolunäytteitä valmistettiin analysointia varten. Soluviljelyn ja näytteiden valmistuksen lisäksi, tutkimuksessa perehdyttiin tarkemmin korkean erotuskyvyn nestekromatografisiin – massaspektrometrisiin menetelmiin ja niiden analytiikkaan, josta pro gradu -tutkielman kirjallinen osa pääosin koostuu. HPLC-MS menetelmien lisäksi kirjallisessa osassa käydään läpi tarkemmin myös muita fluksomiikan ja metabolomiikan tutkimuksessa käytettäviä analyysimenetelmiä. Näiden edellä mainittujen lisäksi kirjallisessa osassa tutustutaan tarkemmin metabolomiikkaan sekä fluksomiikkaan ja siihen, miten näitä biologisia prosesseja voidaan tutkia tarkemmin hyödyntäen kemiaa ja siihen liittyvää analytiikkaa.^{1,2}

2. Metabolia

Metaboliassa eli aineenvaihdunnassa on kyse biologisista prosesseista, joiden tarkoituksena on muuntaa ravintoaineita energiaksi solujen käyttöön sekä syntetisoida tai hajottaa biologisia molekyylejä. Aineenvaihdunnan suurimpana polttoaineena pidetään glukoosia, jolla on keskeinen rooli monien kudosten, kuten aivojen, punasolujen ja lihassolujen toiminnassa. Tyypillisesti aikuinen ihminen tarvitsee 190 g glukoosia päivässä, josta 150 g käytetään aivoille ja 40 g muille kudoksille. Glukoosi luokitellaan joustavaksi metaboliitiksi, jota voidaan muuntaa muiksi polttoaineiksi, kuten lipideiksi, aminohapoiksi tai nukleinihapoiksi. Metabolia voidaan jakaa kahteen eri biologiseen prosessiin, jotka ovat kataboliset eli hajottavat prosessit sekä anaboliset eli rakentavat prosessit (kuva 1).⁴ Kataboliassa energianlähteet, kuten hiilihydraatit, rasvat tai proteiinit hajotetaan ensin välituotteiksi ja siitä katabolian lopputuotteiksi, kuten hiilidioksidiksi tai vedeksi. Anaboliassa puolestaan ravintoaineista

muodostetaan välituotteiden kautta hiilihydraatteja, rasvoja tai proteiineja ja nämä prosessit ovat energiaa kuluttavia reaktioita.



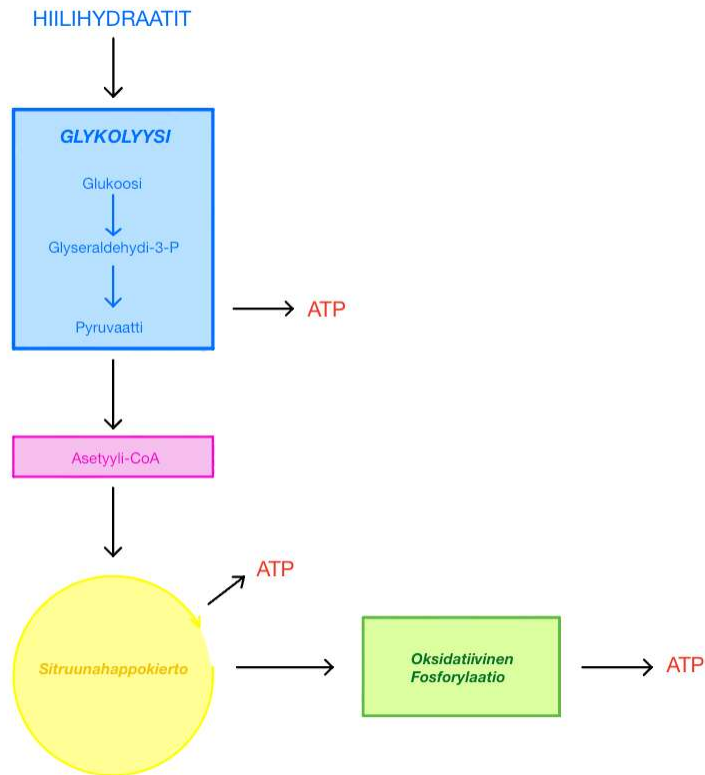
Kuva 1. Kataboliset ja anaboliset prosessit.⁵

2.1 Katabolia

Katabolialla tarkoitetaan biologisia prosesseja, joissa monimutkaisempia yhdisteitä hajotetaan pienemmiksi rakenteiksi muodostaen adensiinitrifosfaattia (ATP, *adenosine triphosphate*), josta voidaan edelleen vapauttaa energiaa ATP:n pilkkoutuessa. Kataboliset reaktiot ovat yleensä eksergonisia, joissa osa energiasta vapautuu lämpönä, mutta suurin osa otetaan talteen ATP:na. ATP:n tuottamisen lisäksi kataboliset reaktiot hapettavat nikotiiniamidiadeniinidinukleotidia (NADH, *nicotinamide adenine dinucleotide*) NAD^+ :si.⁴ Tämän lisäksi kataboliset reaktiot pystyvät tuottamaan yksinkertaisia orgaanisia molekyyliä, joita puolestaan anaboliset reaktiot käyttävät hyödykseen uusien molekyylien rakennusaineena. Kataboliset reaktiot ovat konvergenttisiä tapahtumia, jossa joukosta moninaisia lähtötuotteita muodostetaan harvalukuinen määrä lopputuotteita. Eri lähtöaineista lähtevät kataboliset aineenvaihduntareitit yhdistyvät kolmeen eri reaktiosarjaan, jotka ovat glykolyysi, sitruunahappokierto sekä oksidatiivinen fosforylaatio.⁶

2.1.1 Solun energiantuottoreitit

Solun energiantuottoreitit ovat laaja kokonaisuus, johon kuuluvat glykolyysin lisäksi anaerobinen ja aerobinen energiantuotanto. Anaerobinen sekä aerobinen energiantuotto voidaan jaotella useampaan eri energiantuottoreittiin, mutta keskeisempiä niistä ovat sitruunahappokierto sekä oksidatiivinen fosforylaatio (energiantuottoreitit havainnollistettu kuvassa 2). Glykolyysi, sitruunahappokierto sekä oksidatiivinen fosforylaatio kytkeytyvät toisiinsa ja ne toimivat enemmän tai vähemmän yhtä aikaa. Glykolyysi, sitruunahappokierto sekä oksidatiivinen fosforylaatio kytkeytyvät toisiinsa, kun puhutaan energian tuottamisesta ja glukoosin hajottamisesta eri komponenteiksi. Glykolyysi on vaihe, josta solun energian tuotanto alkaa ja siinä hiilihydraatti, kuten glukoosi, hajotetaan 10 eri vaiheen kautta pyruvaatiksi. Kun pyruvaatti on muodostunut glykolyysin lopputuotteena, siirrytään energiantuotannossa sitruunahappokiertoon. Ennen sitruunahappokiertoa glykolyysin lopputuote, pyruvaatti, muutetaan asetyylikoentsyymi-A:ksi (asetyyli-KoA), joka siirtyy sitruunahappokiertoon käytettäväksi. Glykolyysin ja sitruunahappokierron aikana pelkistytävä NADH siirtyy puolestaan oksidatiivisen fosforylaation elektroninsiirtoketjuun, jossa happimolekyylit pelkistetään vedeksi NADH avulla. Kaikki nämä edellä mainitut aineenvaihduntareitit tuottavat prosessiensa aikana ATP:a ja kokonaisuudessaan yhdestä glukoosimolekyylistä, eli hiilihydraatti lähtöaineesta, voidaan tuottaa noin 30 ATP-molekyyliä.⁶



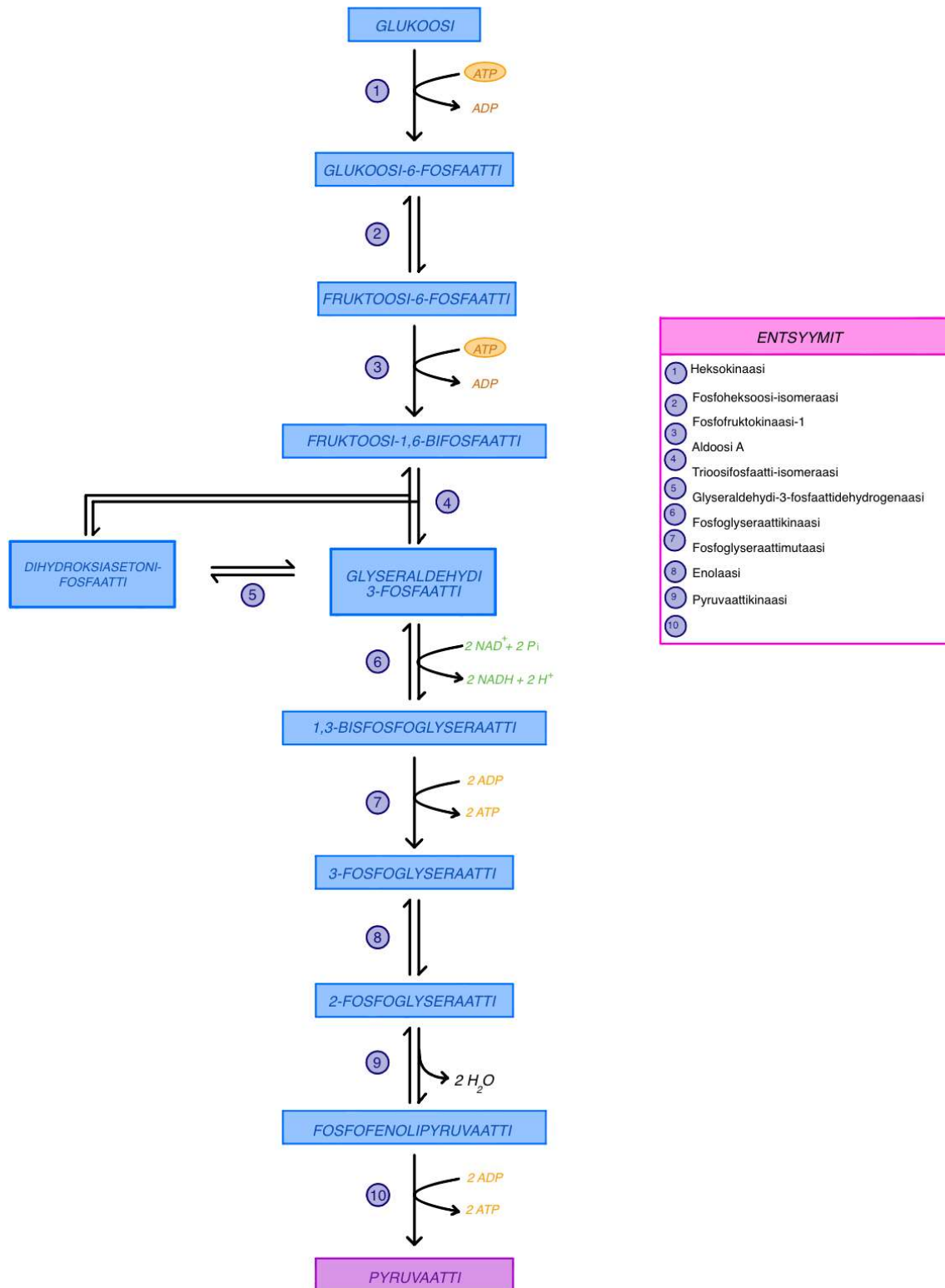
Kuva 2. Solun energiatuottoreitit ja niiden kytkeytyminen toisiinsa.

2.1.2 Glykolyysi

Glykolyysi, toiselta nimeltään Embden-Meyerhofin reitti, on aineenvaihduntareitti, jossa glukoosia hajotetaan pyruvaatiksi ja sivutuotteena muodostuu kaksi ATP-molekyyliä sekä kaksi NADH-molekyyliä (glykolyysin reaktiot havainnollistettu kuvassa 3). Aineenvaihduntareitin isoimpana roolina on tuottaa ATP:a solujen kasvuun sekä ylläpitämiseen ja se tapahtuu tehokkaammin aerobisissa kuin anaerobisissa olosuhteissa. Aiheeseen liittyvien tutkimusten mukaan on todettu, että aerobisissa olosuhteissa energiantuotto jatkuu glykolyysin jälkeen, mutta puolestaan hapettomissa olosuhteissa lopputuote poistetaan solusta.⁷

Glykolyysi tapahtuu solun solulimassa, jonne glukoosi päätyy yleisimmin solun ulkopuolelta solukalvolla olevien glukoosikuljettajien avulla. Glukoosin siirtyminen solukalvon läpi tapahtuu osmoottisesti eli suuremmasta pitoisuudesta pienempään. Vaihtoehtoisesti glykolyysissä voidaan hyödyntää solun sisäisiä glykogeenivarastoja, jossa glykogeeni muunnetaan glykogeenifosforylaasi-entsyymien avulla glukoosi-1-fosfaatiksi, joka voidaan siirtää glykolyysiin käytettäväksi. Edellä mainittua reaktiota kutsutaan glykogenolyysiksi. Glykolyysissä glukoosia muunnetaan 11 eri entsyymien avulla sokerifosfaattiväliaineiksi, josta reaktion lopputuotteena syntyy pyruvaattia (glykolyysiin osallistuvat entsyymit ovat näkyvissä kuvassa 3).⁶

Glykolyysin reaktiosarja alkaa siitä, kun glukoosi fosforyloidaan glukoosi-6-fosfaatiksi glykolyysin ensimmäisessä vaiheessa heksokinaasi entsyymien avulla. Tämän jälkeen glukoosi-6-fosfaatti isomerisoidaan fosfoheksaosi-isomeraasin avulla fruktoosi-6-fosfaatiksi. Kun fruktoosi-6-fosfaatti on saatu isomerisoitua, fosforyloidaan molekyyli toisen kerran, fosfofruktokinaasi-1 entsyymien avulla, fruktoosi-1,6-bisfosfaatiksi. Molemmat fosforyloinnit eli vaiheet 1 ja 3 vaativat energiaa eli ATP:a tapahtuakseen ja tämä muodostaa sivutuotteena adenosinidifosfaattia (ADP, *adenosine biphosphate*). Fruktoosi-1,6-bisfosfaatti pilkotaan aldolaasi A entsyymien avulla kahdeksi väliaineeksi, jotka ovat dihydroksiasetonifosfaatti ja glyseraldehydi-3-fosfaatti. Näitä edellä mainittuja väliaineita kutsutaan yleiseltä nimitykseltään trioosifosfaateiksi ja ne voivat isomerisoidua helposti toisikseen trioosifosfaatti-isomeraasi entsyymien avulla. Glykolyysin reaktiosarja kuitenkin jatkuu glyseraldehydi-3-fosfaatista, jossa se hapetetaan glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasin katalysoimana 1,3-bisfosfoglyseraateiksi. Tässä reaktiovaiheessa entsyymien koentsyyminä toimii NAD^+ , joka pelkistyy reaktiossa NADH :ksi. Reaktiovaiheessa 7 1,3-bisfosfaattiglyseraatin yksi fosfaattiryhmistä siirretään fosfoglyseraattikinaasi entsyymien avulla ADP:lle muodostaen ATP:a ja samalla muodostuu myös 3-fosfoglyseraatti. Tämä väliaine isomerisoidaan fosfoglyseraattimutaasin avulla 2-fosfoglyseraateiksi, joka muuntuu vielä tästä, vaiheessa 9, fosfoenolipyyvaatiksi. Fosfoenolipyyvaatti fosforyloi ADP:ta ATP:ksi pyruvaattikinaasin katalysoimana tuottaen glykolyysin lopputuotteena pyruvaattia.⁶

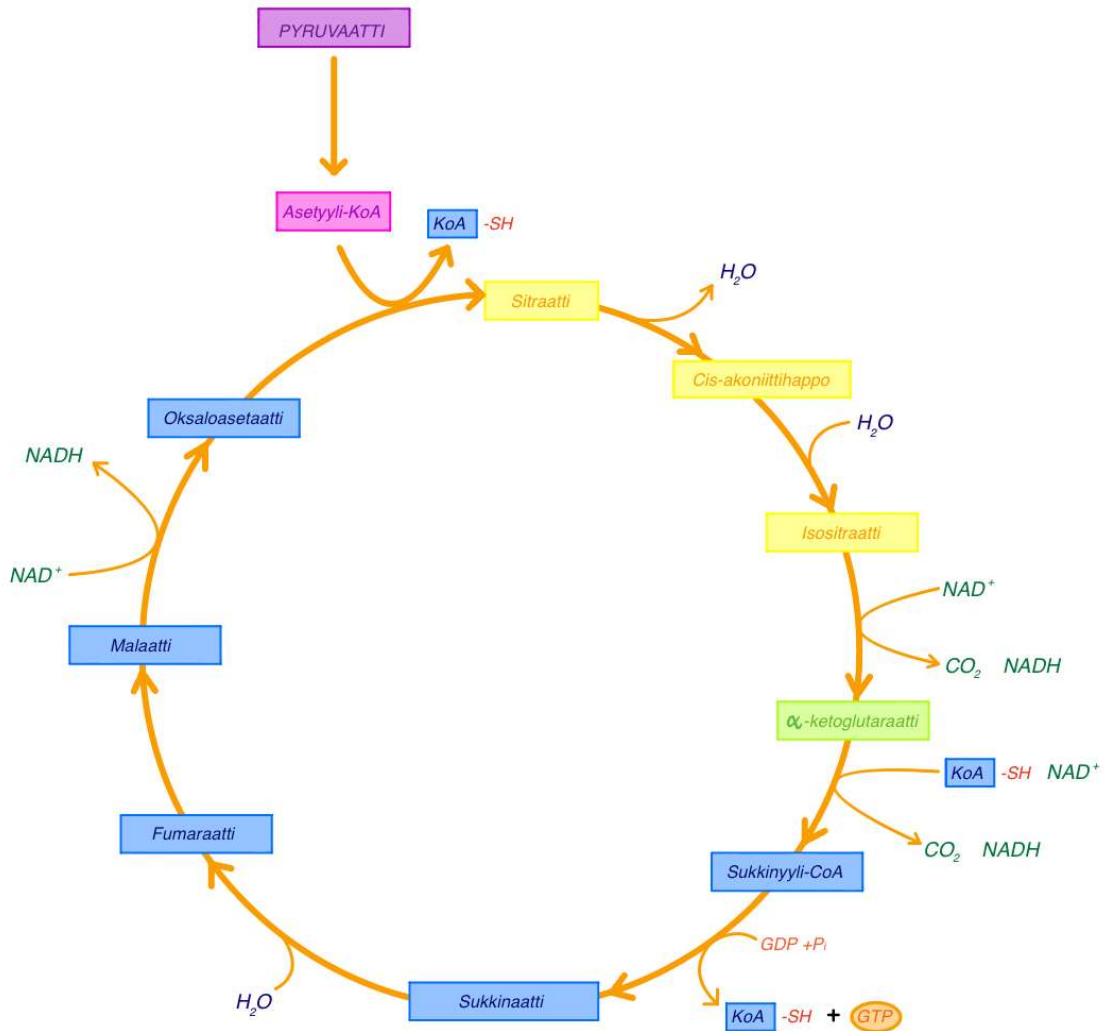


Kuva 3. Glykolyysin eri vaiheet ja siihen osallistuvat entsyymit.

2.1.3 Anaerobinen ja aerobinen energiantuotanto

Anaerobisen ja aerobisen energiantuotannon erona on se, että nimensä mukaisesti toinen tapahtuu hapettomissa ja toinen hapellisissa olosuhteissa tuottaen energiaa solujen käyttöön. Molemmat energiantuottotavat ovat tärkeitä solujen kasvussa ja ylläpidossa, mutta tutkimusten mukaan on todettu, että kvantitatiivisesta näkökulmasta tehokkain tapa tuottaa ATP:a solujen käyttöön on aerobisissa olosuhteissa oksidatiivisella fosforylaatiolla. Oksidatiivisen fosforylaation lisäksi ATP:a voidaan tuottaa aerobisissa olosuhteissa glykolyysin ja sitruunahappokierron avulla. Vaikka aerobinen energiantuotto on tehokkain tapa tuottaa energiaa, voidaan ATP:a tuottaa, vaikkakin vähemmän tehokkaammin, anaerobisissa olosuhteissa substraattitason fosforylaatiolla fosfokreatiinista. Fosfokreatiini on tärkeä ns. korkean energian hätävarasto, jonka avulla voidaan tuottaa nopeasti ATP:a lihasten supistumista varten anaerobisesti. Koska kyseessä on hätävarasto, voidaan sitä hyödyntää solun energiantuotannossa vain hetkellisesti, koska tämä tehokas reaktio kestää vain muutamia sekunteja. Kun fosfokreatiini varastot on kulutettu loppuun urheilusuorituksen aikana, lepovaiheessa lihassoluihin muodostunut kreatiini fosforyloidaan kreatiinikinaasin avulla takaisin fosfokreatiiniksi.⁸

Jos soluissa energiantuotto tapahtuu kuitenkin aerobisissa olosuhteissa, glykolyysissa muodostunut pyruvaatti fermentoituu joko laktaatiksi tai se hapettuu asetyyli-KoA:ksi. Hapettunut asetyyli-KoA siirtyy sitruunahappokiertoon, toiselta nimeltään Krebsin sykli, käsiteltäväksi, jossa syntyy lopputuotteena hiilidioksidia sekä sivutuotteena NADH:ta ja ATP:a. Sitruunahappokierto toimii niin sanottuna metabolisena uunina, joka sijaitsee solun mitokondrion matriksissa, ja se koostuu kahdeksasta eri vaiheesta, joita katalysoi niille spesifit entsyymit.^{9,10} Sitruunahappokierto alkaa yhdistymisreaktiolla, jossa asetyyli-KoA reagoi oksaloasetaatin kanssa käynnistäen reaktiosarjan. Tämä yhdistymisreaktio uudistuu aina uudelleen, jonka seurauksena sitruunahappokierron reaktiot voivat järjestyä kierron muotoon. Sitruunahappokierron päätehtävänä on hapettaa asetyyliryhmiä, mutta tämän lisäksi sen muodostamia välituotteita hyödynnetään monissa biosynteesissä reaktioissa lähtöaineena.⁶ (Sitruunahappokierron eri vaiheet esitettynä kuvassa 4)



Kuva 4. Sitruunahappokierto eri vaiheineen.

Kuten jo aiemmin todettiin, sitruunahappokierron reaktiosarja käynnistyy yhdistymisreaktiolla, jossa oksaloasettaatti ja asetyyli-KoA yhdistyvät sitraatiksi sitraattisyntaasi entsyymin katalysoimana. Sitraatista lohkeaa vettä akonitaasientsyymin avulla *cis*-akoniittihappoa, johon puolestaan vesi sitoutuu uudelleen, mutta eri tavalla, muodostaen Isositraattia. Isositraatti tämän jälkeen hapetuu isositraattidehydrogenaasi entsyymin avulla α -ketoglularaatiksi, vapauttaen samalla mitokondrion matriksiin vetyioneita ja elektroneita, jotka puolestaan sitoutuvat NAD^+ kanssa muodostaen NADH:ta. Tätä edellä mainittua reaktiota kutsutaan oksidaatiiviseksi dekarboksylaatioksi, jossa yksi asetyyli-KoA:sta peräisin oleva hiiliatomi irtoaa rakenteesta hiilidioksina muodostaen α -ketoglularaattia. Koska α -ketoglularaatti on pyruvaatin tapaan ketohappo, on sitruunahappokierron seuraava vaihe hyvin samankaltainen

pyruvaattihydrogenaasireaktion kanssa, jossa α -ketoglutaraatti muuttuu sukkinyyli-KoA:ksi ja sitä katalysoi α -ketoglutaraattihydrogenaasi entsyymi. Sukkinyyli-KoA on rakenteeltaan hyvin epästabiili, jonka vuoksi se pyrkii voimakkaasti hajoamaan. Tätä hajoamisreaktioita katalysoi sukkinyyli-KoA-syntetaasi ja sen katalysoimana sukkinyyli-KoA hajoaa koentsyymi A:ksi ja sukkinatiksi. Hajoamisen yhteydessä tapahtuu guanosiinidifosfaatin (GDP, *guanosine biphosphate*) fosforylaatio guanosiinitrifosfaatiksi (GTP, *guanosine triphosphate*). Kun sukkinatit on muodostunut, hapettuu se sitruunahappokierrossa edelleen fumaratiksi ja tätä reaktiota katalysoi sukkinatidehydrogenaasi entsyymi, joka on mitokondrion sisäkalvon kalvoentsyymi. Tämä entsyymi voi syöttää reaktiossa saamansa elektronit suoraan mitokondrion sisäkalvolla sijaitsevaan elektroninsiirtoketjuun. Elektroninsiirtoketju on myös yksi solun energiantuottotavoista, mutta tämän tutkimuksen kannalta sitä ei tarkastella sen tarkemmin. Fumaraatin rakenne sisältää kaksoissidoksen vierekkäisten hiiliatomien välillä ja näin ollen se ottaa mielellään vastaan vesimolekyylin, kun fumarasi entsyymi katalysoi reaktioita muodostaen malaattia. Malaatti puolestaan hapettuu malaattidehydrogenaasientsyymin avulla sitruunahapon lopputuotteeksi (samalla lähtöaine) eli oksaloasetaatiksi. Näin ollen on saatu sitruunahappokierron yksi kierto päätökseen ja lopputuloksena kierrosta syntyy kahden hiilidioksidimolekyylin lisäksi kolme NADH:ta, yksi FADH₂ (sukkinatidehydrogenaasin katalysoimassa reaktiossa) ja yksi GTP.⁶

Glykolyysin sekä sitruunahappokierron lisäksi solun kataboliseen energiantuotantoon osallistuu oksidatiivinen fosforylaatio. Oksidatiivinen fosforylaatio koostuu kahdesta osasta, jotka ovat elektroninsiirtoketju sekä ATP-synteesi. Sen tehtävänä on tuottaa ATP:a ja hapettaa koentsyymeja kuten NADH:ta. Glykolyysi sekä sitruunahappokierto ovat ensisijaisia oksidatiivisen fosforylaation säätelijöitä, koska ne tuottavat substraatteja (pelkistettyjä koentsyymeja) sen aktivoimiseksi. Oksidatiivinen fosforylaatio tapahtuu eukaryooteilla mitokondrion sisäkalvolla.¹¹

Tutkimuksen kannalta merkittävänä aineenvaihduntareittinä, edellä mainittujen energiantuottoreittien lisäksi, on hyvä mainita myös pentoosifosfaattireitti (PPP, *pentose phosphate pathway*), jonka välituotteilla on merkittävä rooli aminohappojen syntetisoinnissa. Tämän lisäksi PPP on peruskomponentti solujen aineenvaihdunnan kannalta. Se tarjoaa pelkistäviä komponentteja anabolisiin reaktioihin sekä on kriittinen säätelijä redox-tasapainon ylläpitämisessä. PPP voidaan jakaa kahteen vaiheeseen, oksidatiiviseen ja ei-oksidatiiviseen

reaktioon. Oksidatiivinen vaihe koostuu neljästä eri vaiheesta ja ei-oksidatiivinen vaihe viidestä. Nämä kaksi vaihetta tapahtuvat peräkkäin siten, että ensin on oksidatiivinen vaihe, jota seuraa ei-oksidatiivinen.¹²

Kuten jo aiemmin todettiin, PPP on keskeinen osa aineenvaihduntaverkostoa ja se muun muassa yhdistää glykolyysin sekä aminohapposynteesin toisiinsa. PPP:n virtaus (*flux*) ja säätely vaikuttavat sen viereisiin aineenvaihduntareitteihin, mikä osaltaan selittää sen, että sen toiminta säätelee paljolti muita biokemiallisia aineenvaihduntareittejä. PPP muodostaa lähtökohtaisesti NADH:a, pentooseja sekä riboosi-5-fosfaattia. Aminohappojen syntetisoimista varten tarvittava välituotteet, erytroosi-4-fosfaatti ja riboosi-5-fosfaatti, syntyvät PPP:n ei-oksidatiivisen vaiheen aikana.¹²

2.2 Anabolia

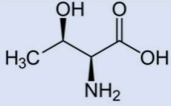
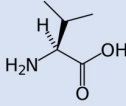
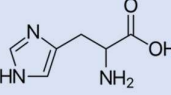
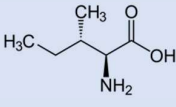
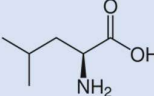
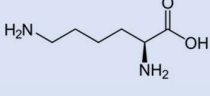
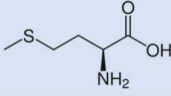
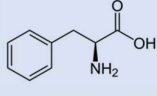
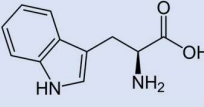
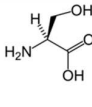
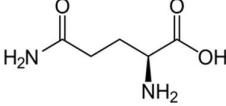
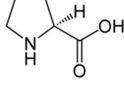
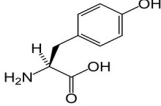
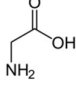
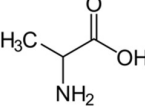
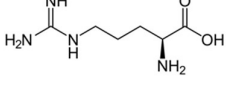
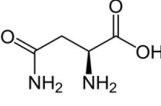
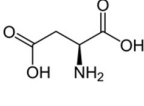
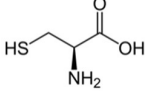
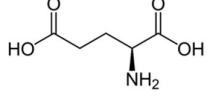
Katabolisten reaktioiden vastakohtana ovat anaboliset reaktiot, toiselta nimeltään rakennusaineenvaihdunta, joiden vastuulla on monimuotoisten ja monimutkaisten biomolekyylien syntetisointi yksinkertaisemmista lähtöaineista. Anaboliset reaktiot ovat endergonisia reaktioita, jotka vaativat toimiakseen energiaa eli ATP:a.¹ Anabolisten reaktioiden avulla solut syntetisoivat hiilihydraatteja, lipidejä, nukleiinihappoja sekä proteiineja, joita hyödynnetään kudosten, kuten lihaskudoksen, rakennusaineena.

Aiemmissä kappaleissa perehdyttiin katabolisiin reaktioihin, joissa ravinteita hajotettiin yksinkertaisiksi metaboliitteiksi, kuten pyruvaatiksi sekä asetyyli-KoA:ksi, samalla vapauttaen prosesseissa ATP:a sekä NADH:a. Kokonaisuudessaan katabolisissa reaktioissa syntyy 12 kappaletta eri metaboliitteja, joita voidaan puolestaan hyödyntää anabolisissa reaktioissa biomolekyylien lähtöaineena. Nämä edellä mainitut tärkeimmät 12 metaboliittia ovat glukoosi-6-fosfaatti (G6P), fruktoosi-6-fosfaatti (F6P), riboosi-5-fosfaatti, erytroosi-4-fosfaatti, glyseraldehydi-3-fosfaatti, 3-fosfoglyseraatti, fosfopenolipyruvaatti, pyruvaatti, asetyyli-KoA, 2-oksoglutaraatti, oksaaloasetatti ja sukkinyyli-KoA. Metaboliiteista muodostettavia biomolekyyliä on olemassa arvioltaan noin 50 kappaletta, joihin kuuluvat muun muassa

aminohapot, rasvahapot ja nukleotidit. 12 metaboliitin joukkoa käytetään useissa solun reaktioissa, mutta näiden lisäksi merkittävimpinä lähtöaineina ovat glutamaatti sekä glutamiini, jotka osallistuvat aminoryhmän luovuttajina lukuisissa aminohappojen ja nukleotidien synteeseissä.¹³

Tämän pro gradu -tutkimuksen pääpaino keskittyy aminohappojen muodostumiseen ja siihen liittyviin aineenvaihduntareitteihin. Aminohappojen synteesi kuuluu anabolisiin reaktioihin, jossa pienemmistä lähtöaineista muodostetaan aminohappoja. Kuten jo aikaisemmissa kappaleissa todettiin, aminohappoja voidaan tuottaa glykolyysin, sitruunahappokierron sekä pentoosifosfaattireitin välituotteiden avulla. Aminohappoja on yhteensä 20 kappaletta, jotka ovat ihmiselle välttämättömiä. Ihmisen keho pystyy itse tuottamaan näistä välttämättömistä aminohapoista 11 ja loput 9 tulee saada ravinnosta (taulukossa 1 on esitetty 20 välttämätöntä aminohappoa ja niiden rakennekaavat).

Taulukko 1. 20 välttämätöntä aminohappoa ja niiden rakennekaavat (Sinisellä pohjalla ravinnosta saatavat 9 välttämätöntä aminohappoa)

Aminohappo	Rakennekaava	Aminohappo	Rakennekaava
Treoniini		Valiini	
Histidiini		Isoleusiini	
Leusiini		Lysiini	
Metioniini		Fenyylialaniini	
Tryptofaani		Seriini	
Glutamiini		Proliini	
Tyrosiini		Glysiini	
Alaniini		Argiini	
Asparagiini		Aspartaatti	
Kysteiini		Glutamaatti	

3. Fluksomiikka

Fluksomiikka lukeutuu yhdeksi ”omiikan” tieteenaloista, joka yhdistää genomiikan, transkriptomiikan, proteomiikan sekä metabolomiikan toisiinsa. Fluksomiikan tutkimus on kehittynyt kovaa vauhtia viimeisen kahden vuosikymmenen aikana ja yksinkertaisuudessaan sen tarkoituksena on mitata kaikkien solunsisäisten virtausten nopeuksia aineenvaihdunnassa. Viime aikoina fluksomiikasta, ja sen tutkimisesta, on tullut yksi tärkeimmistä tutkimussuuntauksista metabolisten fenotyyppien analysoinnissa. Fluksomiikan tutkimisessa hyödynnetään suurelta osin ^{13}C -isotooppileimattuja molekyyliä, joiden avulla voidaan seurata solujen aineenvaihduntareittien käyttäytymistä sekä toimintaa. Fluksomiikan avulla voidaan tutkia valtava määrä erilaisia reaktioita soluissa, kuten anabolisia ja katabolisia reaktioita sekä metaboliittien virtausta soluihin sisälle ja sieltä ulos. Fluksomiikkaa ja sen tutkimusta hyödynnetään paljon bioteknologiassa sekä farmakologiassa. Sen tutkimisessa hyödynnetään hyvin paljon kemian analyyttisiä menetelmiä, kuten ydinmagneettista resonanssispektroskopiaa (NMR, *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*) ja massaspektrometriaa (MS, *mass spectrometry*).³

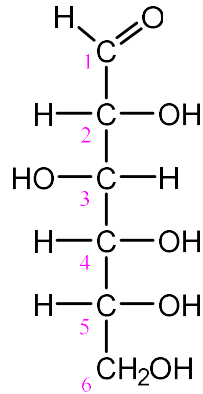
3.1 Aineenvaihdunta ja isotooppijäljitys

Kuten jo aiemmin todettiin fluksomiikka keskittyy tieteen alana tutkimaan aineenvaihduntareittejä ja etenkin sitä, kuinka nopeasti ne tuottavat aineenvaihduntatuotteita. Fluksomiikan tutkimuksessa hyödynnetään suurelta osin isotooppijäljitystä, jossa nykypäivänä yleisimmin käytetään stabiileja isotooppeja, kuten ^2H , ^{13}C , ^{15}N ja ^{18}O . Kuitenkin fluksomiikan tutkimuksen näkökulmasta näistä edellä mainituista isotoopeista ^{13}C -isotooppi on yleisimmin käytetty, koska suurin osa bio-orgaanisista molekyyleistä sisältää luonnollisesti tätä kyseistä isotooppia. Puolestaan ^{15}N -isotooppia voidaan käyttää tutkittaessa aineenvaihduntareittejä, jotka muodostavat tyypeä sisältäviä proteiineja ja nukleiinihappoja. ^2H - ja ^{18}O -isotooppeja esiintyy luonnollisesti hyvin vähän. Ne ovat helposti vaihdettavissa molekyylin rakenteessa, jonka vuoksi niitä harvemmin hyödynnetään isotooppijäljityksessä ja fluksomiikan tutkimisessa. Tämän tutkimuksen osalta keskitytään kuitenkin tarkemmin ^{13}C -isotoopin jäljitykseen ja sen hyödyntämiseen fluksomiikan tutkimisessa.¹⁴

Isotooppijäljitys ja isotooppileimattujen näytteiden valmistus koostuu kolmesta päävaiheesta. Nämä kolme päävaihetta ovat ^{13}C -isotooppileimatun liuoksen valmistus, soluviljelmän ruokkiminen isotooppileimatulla liuoksella sekä aineenvaihduntaprosessin sammuttaminen ja metaboliittien uuttaminen soluviljelmästä. Tätä edellä mainittua kolmen päävaiheen menetelmää kutsutaan hiilimerkintäkoekeksi (CLE, *carbon labelling experiment*). CLE:ssä biologisen järjestelmän (soluviljelmän) ruokkimiseen käytetään yleensä yhtä tai useampaa substraattia eli lähtöainetta. Tässä pro gradu -tutkimuksessa substraattina käytettiin glukoosia, jonka tehtävän oli toimia merkkiaineena ja solujen kasvun lähteenä. Glukoosi päätyy solujen ravinnoksi kasvatusliuoksen avulla, johon on lisätty isotooppileimattua glukoosia. Kun solujen annetaan vaikuttaa isotooppileimatun glukoosiliuoksen kanssa, liitetään isotooppileimattu glukoosi välittömästi kasvatusliuoksesta osaksi solujen aineenvaihduntaa solujen aineenvaihduntareittien aktivoituessa.¹⁴

Koska mikä tahansa analysoinnin kohteena olevan molekyylin rakenteessa oleva hiili voi leimaantua ^{13}C -isotoopilla, voidaan molekyylistä havaita monia erilaisia hiilileimattuja rakenteita. Näitä erilaisia hiilileimattuja rakenteita kutsutaan isotopomeereiksi. Esimerkiksi glukoosi, jolla on rakenteessa kuusi hiiltä, voi leimaantua kuudella eri tavalla ^{13}C -isotoopilla, joten sillä on kuusi eri isotopomeeriä (kuva 5). Toisin sanoen ^{13}C -isotooppi voi sijaita kuudessa eri kohtaa molekyylin rakenteessa. Kuitenkin tämän lisäksi on myös mahdollista, että molekyylin useampi kuin yksi hiiliatomi leimaantuu ^{13}C -isotoopilla. Näitä molekyylin eri rakenteita, joissa yksi tai useampi hiili on leimaantunut ^{13}C -isotoopilla, kutsutaan isotopologeiksi. Esimerkiksi jos glukoosi molekyylin rakenteesta kaksi hiiltä leimaantuu ^{13}C -isotoopilla kutsutaan sen isotopologia M+2. Isotopologiassa M+2 M-kirjaimella merkitään molekyyliä ja +2 kertoo siitä, että molekyyli sisältää kaksi leimattua hiiltä. Nämä molekyylin eri isotopologit voidaan havaita massaspektrometrin avulla. Massaspektrometriassa M+0 molekyyli on leimaamaton molekyyli, jossa kaikki molekyylin rakenteessa olevat hiilet ovat ^{12}C -isotooppeja, kun puolestaan M+3 tarkoittaa, että molekyylin rakenteesta kolme hiiltä on leimaantunut ^{13}C -isotoopilla. Isotooppijäljityksessä ja fluksomiikan tutkimisessä on hyvä kuitenkin huomioida, että ^{13}C -isotooppia voi esiintyä molekyylin rakenteessa 1,11 % todennäköisyydellä sen luonnollisen runsauden vuoksi. Tästä syystä leimaamattomat molekyylit luokitellaan myös ”luonnollisesti leimatuksi”. Luonnollisen runsauden lisäksi on hyvä ottaa huomioon, että isotopomeerien ja isotopologiien määrä on hyvin paljon riippuvainen molekyylin koosta ja sen rakenteesta. Yhteenvetona voidaan kuitenkin todeta, että molekyylin

isotopomeerit eroavat toisistaan isotoopin sijainnin mukaan, kun puolestaan isotopologit eroavat toisistaan niiden isotooppisen koostumuksen mukaan.^{14,15}



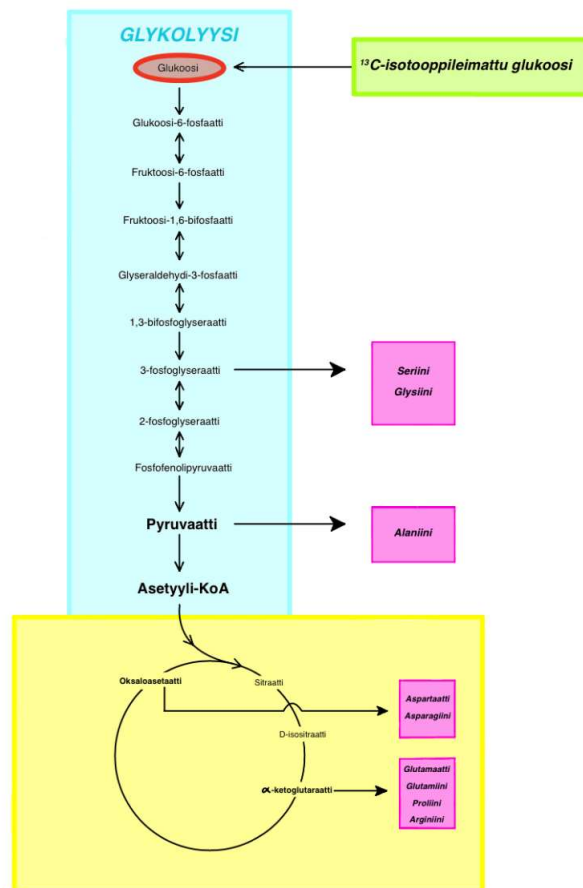
Kuva 5. Glukoosimolekyylin rakenne.

3.2 ¹³C-isotooppileimatun glukoosin päätyminen aminohappoihin

Aminohappoja tuotetaan pääsääntöisesti glykolyysin ja sitruunahappokierron sivutuotteina. Glykolyysin ja sitruunahappokierron tuottamista aminohapoista tämä pro gradu -tutkielma keskittyi tarkastelemaan etenkin seriinin, glysiinin, alaniinin, asparagiinin, aspartaatin, glutamiinin, glutamaatin sekä proliinin muodostumista näitä kyseisiä aineenvaihduntareittejä pitkin. Aminohapoista seriini, glysiini ja alaniini muodostuvat glykolyysin sivutuotteina. Näistä kolmesta aminohaposta seriini ja glysiini tuotetaan 3-fosfoglyseraatista ja alaniini pyruvaatista. Loput mainituista aminohapoista tuotetaan sitruunahappokierron sivutuotteina. Aspartaattia sekä asparagiinia tuotetaan sitruunahappokierron oksaloasetaatista ja glutamaattia, glutamiinia sekä proliinia sitruunahappokierron α -ketoglutaraatista. Osa näistä aminohappojen synteesireiteistä ovat hyvin lyhyitä, kun puolestaan osa hyvinkin monimutkaisia. Kuitenkin yksinkertaisesti havainnollistettuna, edellä mainittuja aminohappoja tuotetaan glykolyysin ja sitruunahappokierron väli- tai lopputuotteista (kuva 6).⁶

Kun solujen annetaan vaikuttaa ¹³C-isotooppileimatun glukoosiliuoksen kanssa, alkavat solut tuottamaan aineenvaihduntatuotteita välittömästi, joihin nämä edellä mainitut aminohapot

myös kuuluvat. Tästä ^{13}C -isotooppileimatusta glukoosiliuoksesta leimautuneet hiilet siirtyvät aineenvaihduntareittejä pitkin aminohappoihin, kun ^{13}C -leimattu glukoosi siirtyy käsiteltäväksi esimerkiksi glykolyysiin ja siitä eteenpäin sitruunahappokiertoon. Leimatun glukoosin siirtyminen aineenvaihduntatuotteisiin voidaan havaita analysoimalla muodostuneita aineenvaihduntatuotteita HPLC-MS analytiikan avulla. Etenkin UHPLC käyttö yhdessä kolmoiskvadrupoli massaspektrometrin kanssa, on tehokas analyysimenetelmä leimatujen metaboliittien tunnistamiseen sekä määrittämiseen. HPLC-MS analytiikkaa voidaan hyödyntää myös havaitsemaan, kuinka nopeasti leimautuneet hiilet siirtyvät aminohappoihin ja tämä voidaan havaita analysoimalla aminohappojen isotopologien runsautta. HPLC-MS analytiikkaa voidaan siis hyödyntää suurelta osin fluksomiikan tutkimuksessa ja sen avulla voidaan saada kattavaa tietoa solunsisäisestä toiminnasta sekä etenkin aineenvaihduntareittien virtauksista eli fluksista.



Kuva 6. Yksinkertaistettu kuva aminohappojen muodostuksesta soluissa ^{13}C -isotooppileimatusta glukoosista glykolyysin ja sitruunahappokierron sivutuotteena.

4. Fluksomiikan tutkimuksen analyttiset menetelmät

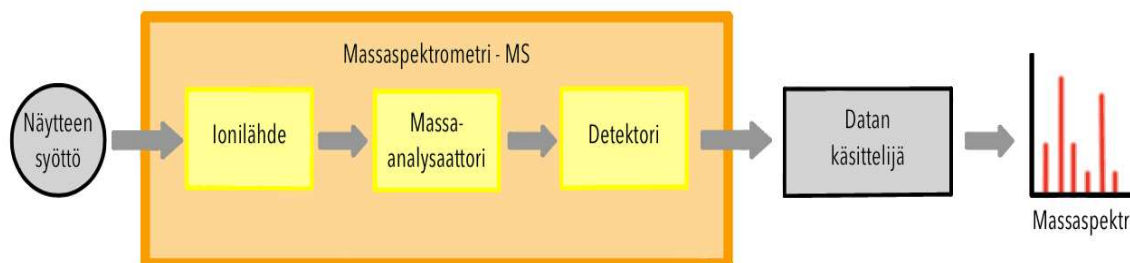
Yleisimpiä metabolomiikan sekä fluksomiikan tutkimisessa käytettäviä analyysimenetelmiä ovat NMR, kaasukromatografia – massaspektrometria (GC-MS, *gas chromatography – mass spectrometry*) ja korkean erotuskyvyn nestekromatografia – massaspektrometria (HPLC-MS, *high performance liquid chromatography – mass spectrometry*). Vaikka NMR pidetään kvantitatiivisempänä ja toistettavuudeltaan parempana menetelmänä, on MS-pohjaisilla menetelmillä etuna se, että ne ovat herkkydeltään huomattavasti parempia. MS voidaan yhdistää monen eri kromatografisen menetelmän kanssa, joka mahdollistaa monenlaisten eri yhdisteiden analysoinnin. GC-MS ja HPLC-MS menetelmät ovat yleisimmin käytettyjä menetelmiä, joiden avulla voidaan tunnistaa tuhansia yhdisteitä samanaikaisesti biologisista näytteistä. Selektiivisyytensä ansiosta nämä menetelmät soveltuvat hyvin metabolomiikan ja etenkin tämän tutkimuksen osalta fluksomiikan tutkimiseen.¹⁶

Kuten edellä jo todettiin, fluksomiikan tutkimuksessa voidaan hyödyntää monia analyttisiä menetelmiä, mutta kuitenkin yleisimmät niistä ovat massaspektrometria (MS, *mass spectrometry*) ja ydinmagneettinen resonanssispektroskopia (NMR, *nuclear magnetic resonance spectroscopy*). Molemmilla näistä edellä mainituista analyttisistä menetelmistä on omat hyödyt ja rajoitteensa. Kuitenkin näitä kahta menetelmää verratessa toisiinsa, voidaan todeta MS soveltuvan herkkyytensä vuoksi paremmin fluksomiikan tutkimiseen. MS herkkyys on kuitenkin hyvin paljon riippuvainen laitteistosta ja etenkin siinä käytetystä ionilähteestä. Verratessa esimerkiksi massaspektrometriassa käytetyimpiä elektroni-ionisaatio – massaspektrometriä (EI-MS, *Electron ionization – mass spectrometry*) ja sähkösumutus-ionisaatio - massaspektrometriä (ESI-MS, *electrospray ionization – mass spectrometry*) toisiinsa, suurin ero muodostuu siihen, kuinka pienen kokoluokan omaavia analyytteja ne voivat havaita. EI-MS on kykenevä havaitsemaan 10^{-6} M konsentraation omaavia analyytteja, kun puolestaan ESI-MS voi havaita jopa 10^{-12} M konsentraation omaavia analyytteja. Näiden edellä mainittujen herkkyyttä parantavien ominaisuuksien lisäksi MS mahdollistaa useita eri tekniikoita, joilla voidaan analysoida tarkastelussa olevia analyytteja.

4.1 Massaspektrometria yleisesti

Massaspektrometria on keskeinen osa nykypäivän laboratorioissa suoritettavaa analytiikkaa. Se on erittäin yleisesti käytetty menetelmä, jonka avulla voidaan tutkia fysikaalisia, kemiallisia ja biologisia ominaisuuksia. Massaspektrometria soveltuu hyvin orgaanisten yhdisteiden tunnistamiseen ja yhdisteiden pitoisuuksien määrittämiseen. Analyysin luonteesta riippumatta, massaspektrometriset menetelmät voidaan jakaa kahteen analyyttiseen painopisteeseen, jotka ovat kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen analyysi. Massaspektrometrian avulla voidaan tunnistaa tuntemattomia yhdisteitä, määrittää yhdisteiden isotooppikoostumuksia sekä määrittää yhdisteiden rakenteita tarkastelemalla niistä muodostuneita pilkeioneita.¹⁷

Massaspektrometri koostuu kolmesta osasta, jotka ovat ionilähde, massa-analysaattori ja detektori (kuva 7). Ionilähteen tehtävänä on ionisoida analysoitavana olevat yhdisteet ja ohjata ne ionisoimisen jälkeen kohti massa-analysaattoria. Ionisaatiomenetelmiä löytyy monia erilaisia, joten oikean ionilähteen valitseminen on avainasemassa siihen, millaisia näytteitä massaspektrometrillä voidaan analysoida. Yleisimpiä massaspektrometriassa käytettäviä ionisaatiomenetelmiä ovat sähkösumutusionisaatio (ESI, *electrospray ionization*), elektroni-ionisaatio (EI, *electron ionization*) ja matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio (MALDI, *matrix-assisted laser desorption ionization*). Kuitenkin näiden lisäksi on olemassa myös monia muita ionisaatiomenetelmiä, kuten kemiallinen ionisaatio (CI, *chemical ionization*), kenttäionisaatio (FI, *field ionization*), kenttädesorptioionisaatio (FD, *field desorption*), desorptiosähkösumutusionisaatio (DESI, *desorption electrospray ionization*) ja ilmanpaineessa tapahtuva kemiallinen ionisaatio (APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*). Kuitenkin tämän tutkimuksen kannalta keskitytään enemmän tarkastelemaan ESI, EI ja MALDI ionisaatiomenetelmiä, jotka ovat käytetyimpiä ionisaatiomenetelmiä niin metabolomiikan kuin fluksomiikan tutkimuksessa. Näiden edellä mainittujen ionisaatiomenetelmien erona on se, että ESI-ionisaatiomenetelmässä näyte sumutetaan ioneiksi jatkuvalla syötöllä hyödyntäen sähkövirtaa, EI-ionisaatiomenetelmässä kaasumainen näyte ionisoidaan sähköllä kuumennetun filamentin eli hehkulangan avulla ja MALDI:ssa näyte ionisoidaan näytelevyltä hyvin lyhyen ja intensiivisen laserpulssein avulla vakuuissa.^{17,18}



Kuva 7. Yksinkertaistettu kuva massaspektrometrin toiminnasta.

Massaspektrometrissä ionilähteen jälkeen tulee massa-analysaattori, jonka tehtävänä on erotella ionilähteen muodostamat ionit toisistaan niiden massan suhteen. Yleisimmin käytetyt massa-analysaattorit ovat lentoaikamassa-analysaattori (TOF, *time of flight*), magneettiset ja sähköstaattiset sektorimassa-analysaattorit, kvadrupolimassa-analysaattori (Q, *quadrupole*), ioniloukkumassa-analysaattori (IT, *ion trap*), orbitrap-massa-analysaattori sekä Fourier-muunnosionisyklotroniresonanssimassa-analysaattori (FTICR, *fourier transform ion cyclotron resonance*).¹⁹ Fluksomiikan sekä metabolomiikan tutkimuksessa on myös hyödynnetty niin kutsuttuja hybridimassa-analysointilaitteita, joissa esimerkiksi TOF- sekä kvadrupolimassa-analysointilaitteita on yhdistetty toisiinsa.

Kun ionit on eroteltu massa-analysointilaitteen avulla, ohjataan ne kohti detektoria, jossa erotellut ionit havaitaan ja niistä tehdään kuvaaja eli massaspekttri. Massaspekttrissä x-akselilla kuvataan detektorilla havaitut ionien m/z -arvot ja y-akselilla näiden havaittujen m/z -arvojen suhteellinen intensiteetti. Kokonaisuudessaan detektorin tehtävänä on muodostaa massa-analysointilaitteelta saapuvista ioneista dataa, jotta voidaan analysoida mitä kukin näyte sisältää ja kuinka paljon.

4.1.1 Ionisaatiomenetelmät

Ionisaatiomenetelmiä tunnetaan useita ja ne sopivat erilaisiin käyttötarkoituksiin ominaisuuksiensa mukaan. Ionisaatiomenetelmät voidaan jakaa karkeasti kahteen osaan, jotka

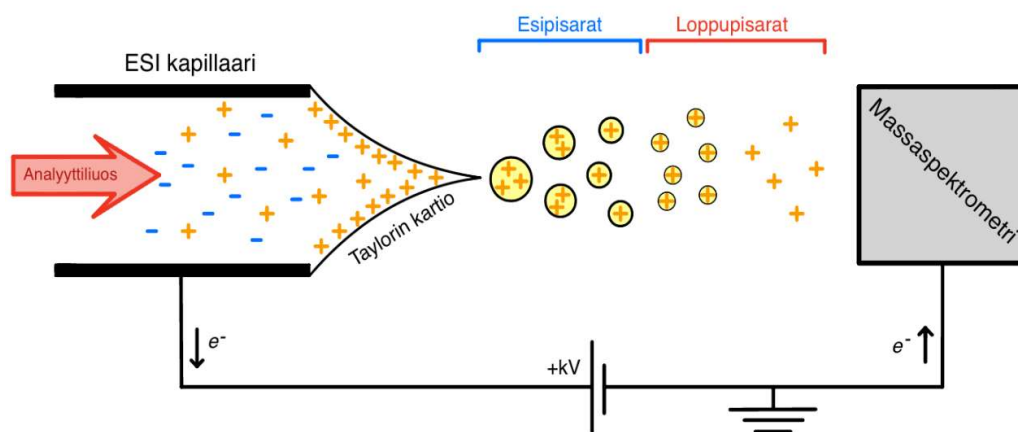
ovat energettiset ja pehmeät ionisaatiomenetelmät. Energeettisiin ionisaatiomenetelmiin kuuluvat EI ja CI, kun puolestaan pehmeisiin ionisaatiomenetelmiin FI, FD, APCI, MALDI, ESI ja DESI. Energeettisissä ionisaatiomenetelmissä ionisaatio tapahtuu kaasufaasissa ja niitä voidaan hyödyntää ainoastaan vain haihtuviin ja lämpöstabiileihin yhdisteisiin. Energeettisissä ionisaatiomenetelmissä havaitaan myös yleensä hyvin paljon fragmentoitumista, jonka vuoksi EI ja CI luokitellaan energettisiin ionisaatiomenetelmiin. On kuitenkin hyvä huomioida, vaikka energettiset ionisaatiomenetelmät tapahtuvat kaasufaasissa ja niitä voidaan hyödyntää ainoastaan haihtuviin ja lämpöstabiileihin yhdisteisiin, ei nämä edellä mainitut seikat yksinään määrittele onko ionisaatiomenetelmä energettinen vai pehmeä ionisaatiomenetelmä. Esimerkiksi vaikka FI ja APCI luokitellaan pehmeisiin ionisaatiomenetelmiin, vaativat ne myös, energettisten ionisaatiomenetelmien tavoin, lämpöstabiilit yhdisteet. Tämän lisäksi, vaikka kenttäionisaatio ja -desorptio ionisaatiomenetelmät tapahtuvat kaasufaasissa, luokitellaan ne pehmeiksi ionisaatiotekniikoiksi, koska niissä fragmentoitumista tapahtuu hyvin vähän tai ei juuri ollenkaan. Sama ilmiö on havaittavissa APCI, MALDI, ESI ja DESI ionisaatiomenetelmissä, joissa yhdisteiden ionisoiminen tapahtuu normaali-ilmanpaineessa, jolloin fragmentoitumista ei tapahdu niin voimakkaasti mitä energettisissä ionisaatiomenetelmissä. Näiden edellä mainittujen seikkojen perusteella oikean ionisaatiomenetelmän valitseminen on iso osa massaspektrometristä tutkimusta. Ihanteellinen ionisaatiomenetelmä valitaan yleensä kiinnostuksen kohteena olevan analyytin rakenteen ja koon perusteella sekä mihin tarkoitukseen analysointia tehdään.²⁰

4.1.1.1 Sähkösumutus-ionisaatio (ESI)

Sähkösumutus-ionisaatio eli ESI on tänä päivänä yksi käytetyimmistä ionisaatiomenetelmistä kemiallisissa ja biokemiallisissa analyyseissa. Yhdistettynä massaspektrometriin se mahdollistaa nestemäisten näytteiden molekyylikoostumusten tutkimisen ja sen avulla voidaan ionisoida monia erilaisia yhdisteitä. ESI:lla ei ole rajoituksia molekyylipainon suhteen, joten se mahdollistaa jopa suurten ei-kovalenttisten proteiinikompleksien tutkimisen. Se kykenee ionisoimaan molekyyliä suoraan nestefaasista ja se on yhteensopiva monien perinteisten kromatografisten menetelmien kanssa, joita hyödynnetään laajalti analyttisessä kemiassa. ESI on maailmanlaajuisesti tunnettu ionisaatiomenetelmä, jolla on erittäin alhainen kemiallinen spesifisyys. Sähkösumutus-ionisaation muodostamat ionit ovat erittäin stabiileja ja

monivaruksellisia, mikä mahdollistaa sen, ettei ionit hajoa nopeasti, kuten esimerkiksi monet MALDI:n tuottamat ionit.²¹

ESI on niin sanottu ”soft” eli pehmeä ionisaatiomenetelmä, jonka toiminta perustuu siihen, että laimennettu näyteliuos ajetaan ohuen metallisen kapillaarin läpi, joka on korkeassa sähkökentässä. Muodostuneet ionit ohjataan kohti kapillaarin kärkeä ja saman varauksen omaavat ionit kerääntyvät liuoksen pinnalla muodostaen Taylorin kartion, joka tämän jälkeen työntyy ulos kapillaarin kärjestä. Kun saman varauksen omaavien ionien välinen repulsio ylittää pintajännityksen, rikkovat ne liuoksen pinnan synnyttäen erittäin varautuneita pisaroista, jotka muodostavat ionisuihkun. Kuumennettu kuivakaasu haihduttaa liuottimen näiden muodostuneiden pisaroiden ympäriltä ja kaasufaasi-ioneita muodostuu. Nämä muodostuneet kaasufaasi ionit ohjataan kohti massa-analysointia, jossa ionit erotellaan toisistaan (kuva 8).²²

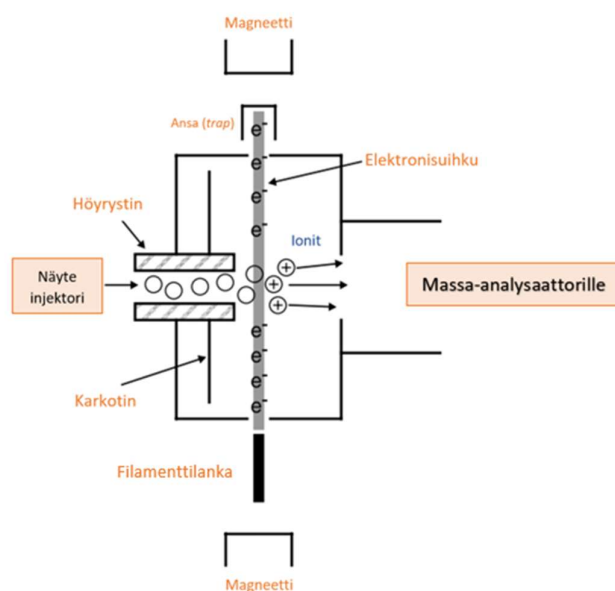


Kuva 8. ESI ionilähde ja sen toimintaperiaate.

4.1.1.2 Elektroni-ionisaatio (EI)

Elektroni-ionisaatio eli EI on niin kutsuttu ”kova” eli energeettinen ionisaatiomenetelmä, jossa molekyylejä pommitetaan elektronisuihkulla, joka saa molekyylit ionisoitumaan sekä yleensä fragmentoitumaan. EI:ssä näyte syötetään ionilähteeseen, jossa näytteessä olevat molekyylit

höyrystetään ja ohjataan kohti kammioita, jossa molekyylit altistetaan elektronisuihkulle (kohtisuorassa näyteinjektoriin nähden). Elektronisuihku syntyy kammioon kuumennetun filamenttilangan avulla, josta se ohjataan suuntaamaan kammion läpi kohti ansaa (*trap*). Kammioin molemmilla reunoilla sijaitsee magneetit, jotka muodostavat kammioon magneettikentän, joka fokusoi elektronisuihkun. Höyrystetty näyte ohjataan muodostetun elektronisuihkun läpi, josta seuraten näytteessä olevat analyytit ionisoituvat elektronimolekyylireaktioiden vaikutuksesta. Tämän jälkeen ionit jatkavat matkaansa kohti massa-analyysaattoria (kuva 9).¹⁹

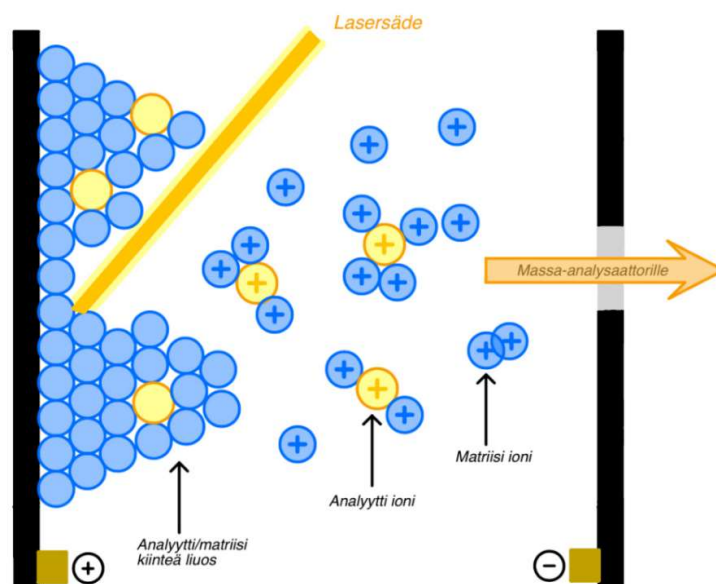


Kuva 9. EI ionilähde ja sen toimintaperiaate.¹⁹

4.1.1.3 Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio (MALDI)

Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio eli MALDI on maailmanlaajuisesti käytetty menetelmä suurten, lämpöstabiliien biomolekyylien karakterisointiin. Sen avulla voidaan muodostaa peptidien ja proteiinien yksivarauksellisia ioneja, mikä puolestaan minimoi spektrien monimutkaisuutta. Etuina tässä ionisaatiomenetelmässä on sen korkea herkkyys, korkea suorituskyky ja hyvä sovellettavuus monenlaisten yhdisteiden analysointiin.

MALDI:ssa näyte asetetaan kohdelevylle yhdessä matriisin kanssa, jolloin matriisi muodostaa kiinteän liuoksen näytteen ja sen analyyttien kanssa. Kohdelevylle kohdistetaan tämä jälkeen laserpulssi, jonka matriisi absorboi itseensä ja sen seurauksena kiinteä näyte/matriisiliuos ionisoituu. Kiinteän liuoksen lämpörelaksaatio saa aikaan sen, että näyte sekä matriisi siirtyy kaasufaasiin ja kaasupilvi muodostuu ionilähteessä. Kaasufaasissa olevat varautuneet ionit ohjataan kohti massa-analysaattoria, jossa ionit erotellaan toisistaan (kuva 10).²³



Kuva 10. MALDI ionilähde ja sen toimintaperiaate.²⁴

4.1.2 Massa-analysaattorit

Massa-analysaattoreiden tehtävänä on erotella ionilähteestä tulevat ionit toisistaan niiden m/z -arvon suhteen. Kuten aiemmin jo todettiin, massa-analysaattoreita löytyy monenlaisia ja ne soveltuvat ominaisuuksiensa perusteella erilaisiin käyttökohteisiin. Riippuen analysoinnin kohteesta voidaan massaspektrometrin ominaisuuksia muokata massa-analysaattorin avulla kullekin mittaukselle sopivaksi. Näin ollen oikean massa-analysaattorin valitseminen ja optimointi on universaali ja käytännöllinen tapa parantaa massaspektrometrin ominaisuuksia.

Massa-analysaattoreita voidaan verrata toisiinsa eri ominaisuuksien perusteella, joita ovat resoluutio, massatarkkuus, massa-alue, herkkyys, dynaaminen alue, kvalifointi herkkyys, nopeus, ionilähde sekä helppokäyttöisyys (taulukko 2).¹⁹ Nykypäivänä tutkimus on keskittynyt etenkin analysoimaan kvadrupoli-, TOF-, IT-, Orbitrap- ja FTICR-analysaattorien vaikutusta massaspektrometrin analysointiominaisuuksiin. Tutkimus aiheen ympärillä on tuottanut paljon analyttisiä sovellutuksia, joiden avulla pystytään optimoimaan massaspektrometrin ominaisuuksia, massa-analysaattorin näkökulmasta, esimerkiksi biologisten ja kemiallisten näytteiden analysoinnissa. Biologisten näytteiden osalta on kuitenkin todettu, että parhaiten niiden analysointiin soveltuvat massa-analysaattorit ovat kvadrupoli-, TOF- sekä Orbitrap-analysaattori, joita käsitellään tarkemmin tulevissa luvuissa.²⁵

Taulukko 2. Eri massa-analysaattoreiden ominaisuuksien vertailua toisiinsa¹⁹

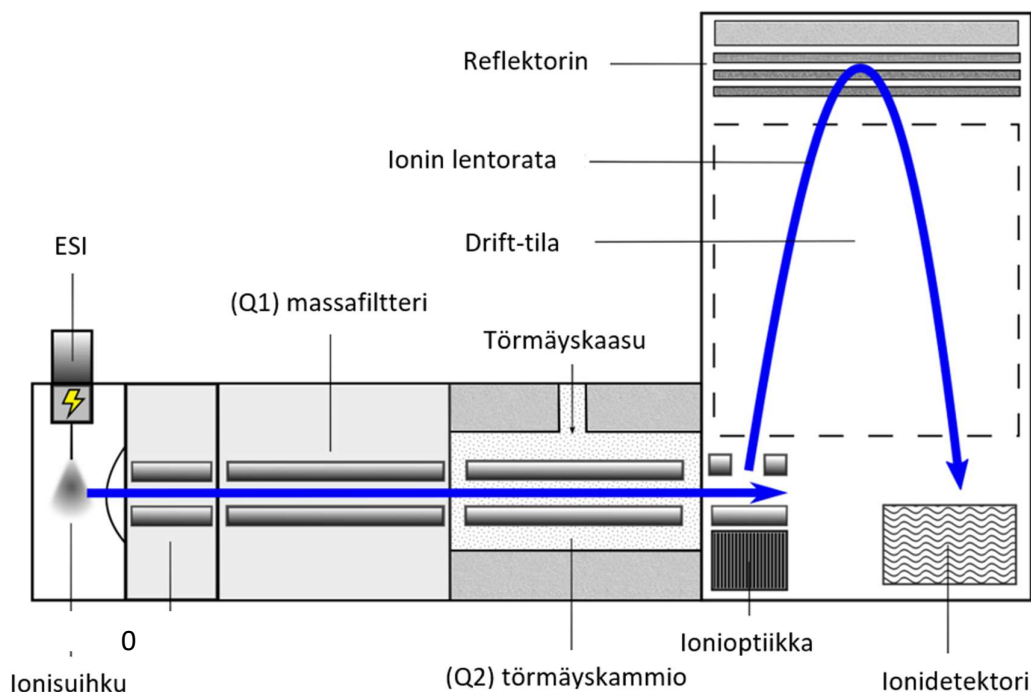
Analyzer	TOF	Sector	Q	IT	Orbitrap	FTICR
Resolution	Low-high	Very high	Low-medium	Low-high	Very high	Highest
Mass accuracy	High	Very high	Low	Low-medium	Very high	Very high
m/z range	Very high	Medium	Low	Low-medium	Low	Medium
Sensitivity	High	High	High	High	Medium	Medium
Dynamic range	Medium	Very high	High	Low-medium	Medium	Medium
Qualification	Medium-good	Very good	Good-very good	Poor	Medium	Medium
Speed	Fast	Slow	Medium-fast	Medium-fast	Slow-medium	Slow-medium
Ion source	Pulsed/continuous	Continuous	Continuous	Pulsed/continuous	Pulsed/continuous	Pulsed/continuous
Handling	Easy-medium	Medium-demanding	Easy	Easy	Medium	Demanding

4.1.2.1 Lentoaikamassa-analysointilaitteisto (TOF)

Lentoaikamassa-analysointilaitteen eli TOF-massa-analysointilaitteen toiminta perustuu siihen, että ionilähteeltä saapuville ioneille annetaan sama liike-energia sähkökentän avulla, josta ne johdetaan tilaan, jossa sähkökenttä ei enää vaikuta. Tällöin ionit alkavat erottumaan toisistaan m/z -arvojen perusteella ja näin ollen, vaikka ioneilla on sama energia, liikkuvat suuren massan ionit pienempi massaisia ioneita hitaammin. Nämä eri ajan matkaavat ionit havaitaan detektorilla, jossa ionien lentoajan sekä niille annetun energian perusteella voidaan laskea ionien m/z -arvot detektorilla havaitusta signaaleista TOF-massa-analysointilaitteisto erottelee ionilähteeltä saapuvat ionit lentoajan mukaan. Aikaero muodostuu alkusignaalin ja pulssin välillä, joka syntyy, kun ioni osuu detektoriin.¹⁹ TOF-massa-analysointilaitteistot ovat usein kytketty yhteen MALDI-ionilähteen kanssa, koska MALDI soveltuu hyvin käytettäväksi TOF-massa-analysointilaitteen kanssa sen tuottaman lyhyen ionisuihkun ansiosta. TOF-massa-analysointilaitteisto voidaan myös kytkeä yhteen toisen massa-analysointilaitteen kanssa niin kutsutuksi hybridianalysointilaitteistiksi. Metabolomiikan ja fluksomiikan tutkimuksen näkökulmasta TOF-analysointilaitteistoa voidaan hyödyntää yhdessä kvadrupolianalysointilaitteen kanssa, jossa nämä kaksi analysointilaitteistoa on kytketty peräkkäin toisiinsa. Tätä hybridianalysointilaitteistoa kutsutaan kvadrupolilentoaikamassa-analysointilaitteistiksi (QTOF, *quadrupole time-of-flight*).¹⁹

QTOF-MS-laitteisto yhdistää kahden erilaisen massa-analysointilaitteen, kvadrupoli- ja lentoaikamassa-analysointilaitteen, edut toisiinsa (kuva 11). Tässä niin kutsutussa uniikissa hybridianalysointilaitteistossa yhdistyy Q-analysointilaitteen korkea yhdisteiden fragmentointitehokkuus sekä TOF-analysointilaitteen nopea analysointitehokkuus sekä korkea massaresoluutiokyky lentoajan suhteen. QTOF-massa-analysointilaitteistossa ensimmäinen kvadrupoli (Q1) toimii niin sanottuna massasuodattimena, jonka avulla voidaan valita spesifi ryhmä ioneita niiden m/z -arvojen suhteen (yleensä ensimmäistä kvadrupolia edeltää Q0 kvadrupoli, joka toimii törmäysvaimentimena). Toisen kvadrupolin (Q2) tehtävänä on toimia törmäyskennona, niin kuin kolmoiskvadrupolissa (kolmoiskvadrupolia tarkastellaan enemmän luvussa 4.1.2.2), jossa valittuja ioneja pommitetaan kaasumolekyyleillä ja siitä seuraten syntyy fragmentteja. Yleensä törmäyskaasuna käytetään joko argonia tai typpeä. Q2 jälkeen ionit kiihdytetään uudelleen vaadittuun energiaan ja ionit kohdistetaan ionioptiikan avulla säteeksi, joka suunnataan tasaisena virtana kohti TOF-analysointilaitteen ionimodulaattoria. Tämä edellä mainittu

vaihe on vielä tarkempi mitä kolmoiskvadrupoli-analyssaattorissa, koska TOF-analyssaattori on paljon herkempi niin sanotulle ionisäteen ”laadulle”, kuin Q3 kolmoiskvadrupolissa. Kun kaikki ionit on saatu ohjattua TOF-analyssaattorin lentoaikaputkeen ja niillä on sama kineettinen energia, erotellaan ne toisistaan niiden massan suhteen. Ionit, joiden massa on kevyempi, on niillä lyhyempi lentoaika, kun puolestaan raskaimmilla ioneilla kestää kauemmin kulkea lentoradalla kohti detektoria. Nykyaikaiset TOF-analyssaattorit käyttävät lisäksi myös reflektroni laitetta, joka korjaa kineettisen energian hajoamista ja avaruudellista leviämistä ionien osalta, jotka omaavat saman m/z -arvon, mutta niillä on eri nopeudet. Tämä heijastuskorjaus mahdollistaa ionien, joilla sama m/z -arvo, saapumisen ilmaisimelle saman aikaisesti. Lisäksi reflektroni parantaa lentoradan pituutta, mikä puolestaan parantaa massaresoluutiota.^{26,27}



Kuva 11. Q\TOF-massa-analyssaattorin rakenne. Kuva muokattu lähteestä.²⁶

QTOF- eli kvadrupolilentoaikamassa-analyssaattoria hyödynnetään nykypäivänä paljon metabolomiikan sekä fluksomiikan tutkimuksessa ja sen avulla voidaan tehdä biologisille

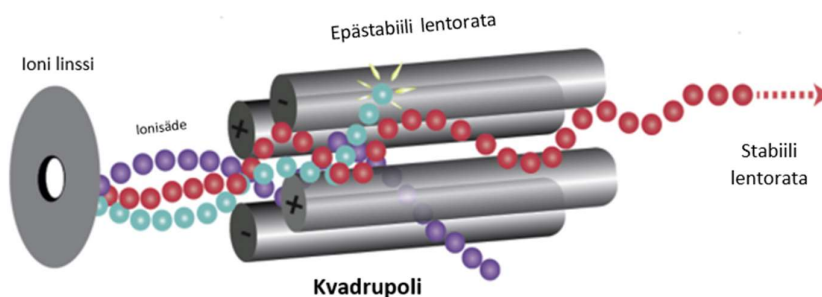
näytteille kohdentamatonta analysointia, jossa näytteen sisältäviä analyytteja havaitaan samanaikaisesti. QTOF-MS käyttö yhdessä UHPLC:n kanssa on saanut paljon huomiota viimeisen vuosikymmenen aikana analyttisessä kemiassa ja sitä on hyödynnetty laajalti biologisten näytteiden seulonnassa, laittomien ja laillisten aineiden analysoimisessa, niin kliinisessä kuin oikeusteknisessä toksikologiassa.^{28,29} Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia – kolmoiskvadrupoli massaspektrometri (UHPLC-QTOF-MS, *ultra-high performance liquid chromatography – quadrupole time-of-flight mass spectrometry*).on hyvin spesifi ja erittäin herkkä menetelmä, joka mahdollistaa tutkimuksen metabolomiikan sekä fluksomiikan tutkimusalueella. Se tarjoaa nopeita sekä kattavia seulontaratkaisuja, jotka ovat saamassa suurta suosioita kliinisissä laboratorioissa yhä enenevässä määrin. Se on laajalti hyväksytty tekniikka monella eri tieteen osa-alueella, kuten biologisessa sekä farmaseuttisessa tutkimuksessa, joihin kuuluu esimerkiksi metaboliittien tunnistus, peptidianalyysi sekä huumeanalytiikka.²⁶

4.1.2.2 Kvadrupolimassa-analysaattori (Q)

Kvadrupolimassa-analysaattorit eli Q-massa-analysaattori koostuvat neljästä lieriömäisestä sauvaelektrodista, jotka on asetettu yhdensuuntaisesti tarkoin määritellyn etäisyyden päähän toisistaan. Kvadrupolimassa-analysaattoreissa ionien erottelu perustuu niiden lentoratojen vakauksien eroihin. Ionit fokusoidaan ionilähteeltä ionilinsin läpi, joka keskittää ionisuihkun tiiviiksi, ja tämä tiivis ionisuihku ohjataan neljän yhdensuuntaisen sauvaelektrodin läpi, joiden välillä vallitsee kohtisuora sähkökenttä. Sähkökenttä muodostetaan sauvaelektrodien välille siten, että kvadrupolin vastakkaiset sauvaelektrodit ovat keskenään samassa sähköisessä potentiaalissa, kun taas puolestaan vierekkäiset ovat toisiinsa nähden vastakkaisissa potentiaaleissa. Sähkökenttä muodostetaan näiden kahden, eri varauksissa olevien, sauvaelektrodien välille tasavirran (DC, *direct current*) ja vaihtovirran (AC, *alternating current*) avulla.³⁰

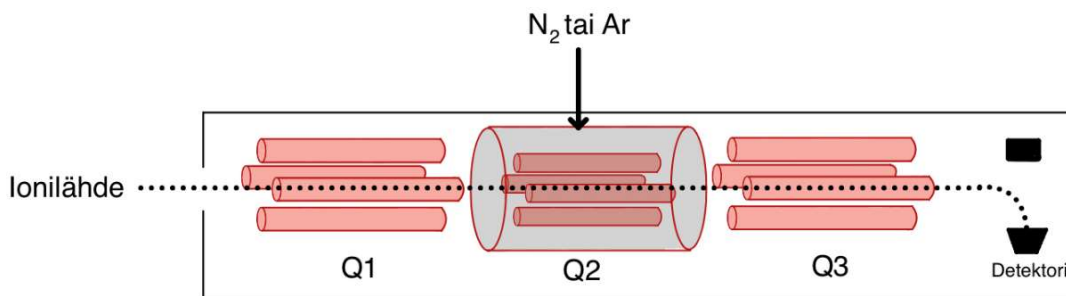
Kvadrupolin tehtävänä on ikään kuin toimia suodattimena, joka antaa ionien kulkea sen läpi riippuen niiden m/z -suhteesta. Kun ionit saapuvat muuttuvaan sähkökenttään, ne kohtaavat puoleensa vetävän voiman, joka muuttuu nopeasti hylkiväksi voimaksi. Tämä saa aikaan sen,

että ionit värähtelevät kohtisuorassa niiden alkuperäiseen liikkeeseen nähden. Jos ionien värähtely on liian suurta, törmäävät ne sauvaelektrodien kanssa eivätkä näin ollen läpäise kvadrupolia eli ioneilla on tällöin epästabiili lentorata. Kuitenkin tietyn m/z -arvon omaavat ionit läpäisevät kvadrupolin, jolloin ne kulkevat kohti detektoria ja havaituista ioneista voidaan muodostaa massaspektri. Kuvassa 12 on havainnollistettu kvadrupolianalysointilaite ja sen toimintaperiaate.³⁰



Kuva 12. Kvadrupolianalysointilaite, sen rakenne ja toiminta. Kuva muokattu lähteestä.³⁰

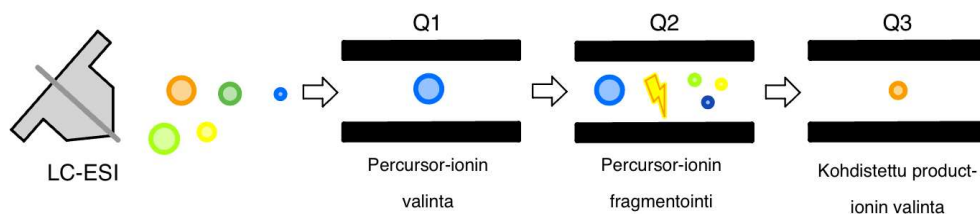
Kuten jo luvussa 4.1.2.1 todettiin, massa-analysointilaitteita voidaan kytkeä peräkkäin niin kutsutuksi hybridianalysointilaitteeksi, josta esimerkkinä käytettiin QTOF-massa-analysointilaitetta. Tämän yhdistelmän lisäksi on myös mahdollista kytkeä kvadrupolimassa-analysointilaitteita sarjaan, joka mahdollistaa monipuolisempia analyyskejä verraten QTOF-massa-analysointilaitteeseen. Hyvä esimerkki tällaisesta sarjaan kytketystä kvadrupolimassa-analysointilaitteesta on kolmoiskvadrupolimassa-analysointilaitte (QQQ, *triple quadrupole*). Kolmoiskvadrupolimassa-analysointilaitte on suosittu menetelmä kohdennetussa analytiikassa ja sitä voidaan hyödyntää metabolomiikan sekä fluksomiikan tutkimuksessa. Kolmoiskvadrupoli koostuu nimensä mukaisesti kolmesta kvadrupolista Q1-3. Ensimmäinen ja kolmas kvadrupoli ovat normaaleja kvadrupoleja, mutta toinen kvadrupoli toimii törmäyskammiona, joka sisältää matalapaineista inerttiä kaasua, kuten N_2 (kuva 13). Toisen kvadrupolin tehtävänä on fragmentoida ensimmäisestä kvadrupolista saapuvat lähtöionit, jonka jälkeen lähtöioneista muodostuneet fragmentoidut ionit eli tuoteionit erotellaan selektiivisesti toisistaan kolmannen kvadrupolin avulla, jonka jälkeen ne havaitaan detektorilla.³¹



Kuva 13. Kolmoiskvadrupolin rakenne.

Kuten aikaisemmin mainittiin kolmoiskvadrupolia voidaan hyödyntää erityisesti kohdennetussa analytiikassa, kun halutaan analysoida suuri määrä eri analyytteja. Kohdennetussa analytiikassa voidaan hyödyntää useita eri tekniikoita, joita ovat muun muassa SIM (*selective ion monitoring*), SRM (*single reaction monitoring*), useiden reaktioiden seuranta (MRM, *multiple reaction monitoring*) sekä MS/MS fragmentointi. Näiden tekniikoiden avulla on mahdollista saada paljon uutta tietoa molekyylien isotooppipattereista, sekä molekyylit voidaan havaita ilman sen suurempaa puhdistamista muista yhdisteistä tekniikoiden korkean massaresoluution ansiosta. Näistä edellä mainituista tekniikoista etenkin MRM on pitkään käytetty metaboliittien kohdennetussa kvantitoinnissa yhdessä kolmoiskvadrupolin kanssa ja sitä pidetään ”kultaisena standardina” pienten molekyylien ja etenkin metaboliittien tutkimuksessa. Tyypillisesti MRM tekniikkaa hyödynnettäessä, MS:n laiteparametrit sekä siirtymät lähtö- ja tuoteionien välillä on esioptimoitu kullekin analysoitavana olevalle metaboliitille, jotta laitteistolla voidaan saavuttaa optimaalinen herkkyys. MRM tekniikassa analyytteja havainnoidaan niille asetetuissa aikaikkunoissa niiden lähtö- ja tuoteionien avulla. Nämä lähtö- ja tuoteionit muodostetaan MS/MS fragmentoinnin avulla eli tandem-massaspektrometrian avulla MRM tekniikkaa hyödyntäessä ensimmäisen kvadrupolin tehtävänä on valita analysoinnin kohteena oleva lähtöioni, toisen kvadrupolin tehtävänä on toimia törmäyskennona lähtöionien fragmentoimiseksi ja kolmannen kvadrupolin tehtävänä on eristää lähtöionin fragmentoitumisesta muodostunut haluttu tuoteioni (kuva 14). Kuitenkin vaikka MRM ja kolmoiskvadrupoli yhdistelmä on todettu erittäin toimivaksi analyysimenetelmäksi tutkittaessa metaboliitteja, on sillä myös omat rajoitteensa. Kolmoiskvadrupoli omaa hyvin alhainen resoluutio, joka saattaa johtaa suhteellisen suureen riippuvuuteen kemiallisesti tuotetuista standardeista kullekin metaboliitille, joita tarvitaan menetelmän rakentamisessa ja kehittämisessä. Näitä edellä mainittuja kemiallisesti tuotettuja

standardeja tarvitaan esimerkiksi metaboliittien retentioaikojen määrittämiseen ja laiteparametrien optimoimiseen.^{14,32}



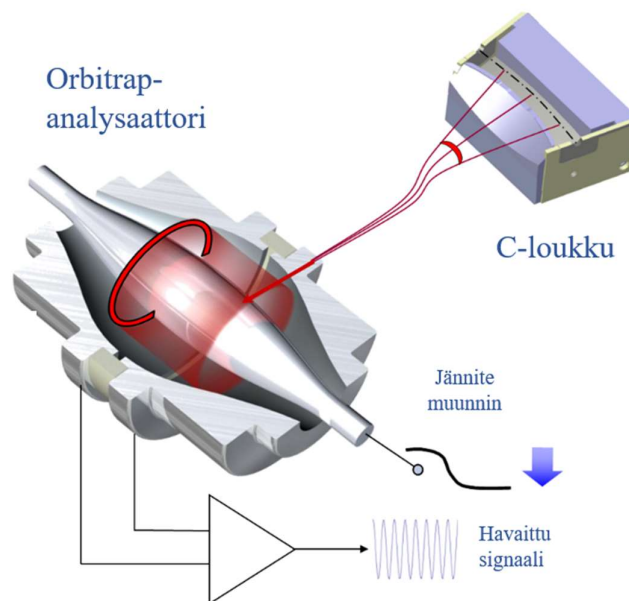
Kuva 14. MRM ja kolmoiskvadrupoli yhdistelmän toimintaperiaate.

4.1.2.3 Orbitrap-massa-analysointilaite

Orbitrap-massa-analysointilaite on uusi lisäys korkea resoluution massaspektrometria analysointilaitteiden perheeseen. Orbitrap-massa-analysointilaitteen kehittäminen sai alkunsa siitä, että haluttiin kehittää massa-analysointilaite, joka peittoi kaikki aikaisempien massa-analysointilaitteiden, kuten FTICR-massa-analysointilaitteen monimutkaisuuden sekä koon ja TOF-massa-analysointilaitteen alhaisen herkkyuden sekä dynaamisen alueen ja resoluution. Orbitrap-massa-analysointilaite yhdistää suuren nopeuden hyviin kvantifointi-ominaisuuksiin ja on suosittu analysointilaite monissa analyttisissä sovellutuksissa. Kuten sen nimestä voidaan päätellä, orbitrap-massa-analysointilaite luokitellaan ioniloukkuksi, mutta se ei ole kuitenkaan tavallinen ioniloukku. Orbitrap-massa-analysointilaitteen toiminta perustuu siihen, että se käyttää sähköstaattisia kenttiä napatakseen ioneita. Näin ollen se poikkeaa tavallisesta ioniloukusta siinä, että se ei pidä ioneja sisällään radiotaajuuden tai magneetin avulla. Ionien erottelu orbitrap-massa-analysointilaitteella perustuu ionien resonanssitaajuuksien eroihin, jotka muodostetaan edellä mainittujen sähköstaattisten kenttien avulla. Orbitrap-analysointilaite koostuu tynnyrimäisestä ontosta elektrodista, jonka sisällä sijaitsee kiinteä elektrodi. Kiinteän elektrodin tarkoituksena on siepata ionit kiertävään liikkeeseen itsensä ympärille. Kiinteä elektrodi ja sen jännite aiheuttaa sen, että ionit jäävät loukkuun ontion elektrodin ja kiinteän elektrodin välille kiertämään elliptisiä ratoja. Ionien saama kiertävä liike muodostaa sähkövirran muutoksia ulkoiselle elektrodille, joka ympäröi kiinteää elektrodia. Nämä

sähkövirran muutoksien aiheuttamat taajuudet muutetaan fourierin-muunnoksen avulla m/z -arvoiksi ja muunnetut m/z -arvot havaitaan massaspektrissä. Jotta ionit saadaan suihkutettua kammioon, ja kiertämään elliptisiä ratoja pitkin, elektrodien välistä jännitettä madalletaan aluksi. Kun ionit on saatu ohjattua kammioon, nostetaan elektrodien välistä jännitettä, jotta ionit voivat saavuttaa halutun kiertoradan.^{33,34}

Yleensä kaupallisissa orbitrap-analysointilaitteissa kammioon saapuvat ionit jaotellaan C-loukun avulla ennen orbitrap kammioon siirtämistä. C-loukku koostuu useista C:n muotoon tavutetuista elektrodeista, joiden keskellä on tila ionien liikkumista varten. Ionien saapuessa C-loukkuun, loukun päällimmäisiin ja alimmaisiiin elektrodeihin muodostetaan muuttuvia sähkökenttiä vaihtovirran avulla, joka johtaa ionit liikkumaan tietylle alueella C-loukussa. Kun ionit ovat saavuttaneet halutun energian, asetetaan C-loukun elektrodeihin erisuuruiset tasavirrat, joka aiheuttaa ionien suihkuna sinkoamisen C:n muotoisen loukun sisäkaarta pitkin ulos orbitrapiin analysoitavaksi. Kuvassa 15 esitetty orbitrap-analysointilaitteen rakenne ja toiminta.³³



Kuva 15. Orbitrap-analysointilaitteen rakenne.

4.1.3 Detektorit

Kun ionit on saatu eroteltua toisistaan massa-analysointilaitteen avulla, voidaan ionit havaita detektorilla niiden m/z -arvojen mukaan. Nykypäivänä on olemassa monia erilaisia detektoreita, joita voidaan hyödyntää massaspektrometriassa. Kuitenkin detektorin valinta riippuu laitteistosta ja siitä millaisia analyttisiä sovellutuksia laitteistolla suoritetaan, koska massaspektrometriassa hyödynnetään erilaisia lähestymistapoja havaitakseen ioneja. Kokonaisuudessaan detektoreiden tehtävä on kuitenkin hyvin yksinkertainen. Se havaitsee ionit aina niiden varauksen, massan ja nopeuden perusteella. Joidenkin detektoreiden, kuten esimerkiksi Faradayn kupin, toiminta perustuu tasavarausvirran muodostumiseen, joka syntyy, kun ioni osuu sen pintaan ja neutralisoituu. Kun taas puolestaan elektronimonistin detektorin toiminta perustuu kineettisen energian siirtoon, kun ionit törmäävät pintaan, joka tuottaa sekundäärisiä elektroneja, joita edelleen vahvistetaan tuottaen sähkövirtaa. Myös osa massa-analysointilaitteista, kuten Orbitrap ja FTICR ovat itsessään jo detektoreita, joten massaspektrometreissa, joissa näitä massa-analysointilaitteita hyödynnetään, ei ole erillistä detektoria. Näiden edellä mainittujen detektorien lisäksi on myös olemassa muita detektoreita, kuten photographic plate- ja electro-optical ion-detektorit, mutta nämä ei ole nykypäivänä enää niin suuressa suosiossa. Kokonaisuudessaan massaspektrometriset detektorit voidaan jakaa kahteen luokkaan. Toinen luokka koostuu detektoreista, jotka laskevat ioneita yksi kerrallaan niiden massan suhteen, kun ne saapuvat peräkkäin detektorille havaittavaksi. Toinen luokka puolestaan koostuu detektoreista, jotka kykenevät laskemaan useita massoja samalla kertaa ja havaitsemaan niitä samanaikaisesti detektorin pinnalla saapumisjärjestyksestä riippumatta.³⁵

4.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia-massaspektrometria (HPLC-MS)

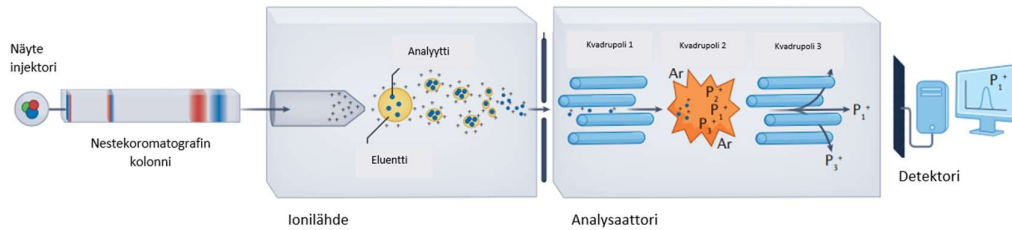
Korkean erotuskyvyn nestekromatografia – massaspektrometria on laajalti käytetty analyysimenetelmä ja sen vahvuus on sen korkea analyttinen selektiivisyys. Tässä kyseisessä analyysimenetelmässä nestekromatografi hoitaa molekyylien erottelun liikkuvan ja kiinteän faasin välisten vuorovaikutusten perusteella, kun puolestaan massaspektrometrin tehtävänä on havaita nämä erotellut analyytit toisistaan. HPLC-MS on hyvin selektiivinen sekä herkkä

analyysimenetelmä ja sen avulla pystytään erottelemaan haluttuja analyytteja toisistaan hyvinkin haastavista näytematriiseista. Analyysimenetelmää voidaan soveltaa monenlaisiin biologisiin molekyyliin ja sen analyysinopeuden ansioista on mahdollista analysoida useita yhdisteitä samanaikaisesti. HPLC-MS avaa ovet moniin erilaisiin analyysihin riippuen siitä mitä halutaan tutkia. Massaspektrometrin massa-analysointia vaihtamalla, voidaan luoda uusia ulottuvuuksia analyysihin ja tämän avulla HPLC-MS analytiikka voidaan hyödyntää monella eri tieteen osa-alueella.³¹

HPLC-MS analytiikassa voidaan hyödyntää perinteisen HPLC:n sijasta myös ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia (UHPLC, *ultra-high performance liquid chromatography*). Nämä edellä mainitut kaksi nestekromatografian menetelmää eroavat toisistaan muun muassa partikkelikoon, kolonnin mittojen, virtausnopeuksien sekä paineen osalta. Partikkelikoon osalta HPLC:ssä kiinteän faasin partikkelikoot ovat tyypillisesti luokkaa 3-5 μm , kun puolestaan UHPLC:llä on tunnusomaista 2 μm tai jopa sitä pienempi partikkelikoko kiinteän faasin osalta. Kolonnin mittojen osalta nestekromatografien eroavat toisistaan partikkelikoon tavoin tyypillisesti siinä, että mitat pienenevät UHPLC:llä. Tyypillinen HPLC-kolonnin sisähalkaisija on 4,6 mm ja pituus 150 mm, kun puolestaan UHPLC-kolonnin sisähalkaisija on luokkaa 2,1 mm tai jopa vähemmän ja sen pituus on lyhempi mitä HPLC:n eli noin 100 mm luokkaa. Virtausnopeuksien osalta nestekromatografien ero näkyy siinä, että HPLC-laitteistolla voidaan operoida huomattavasti pienemmällä virtausnopeuksilla (0,2-0,7 ml/min), kun UHPLC-laitteistolla vastaavasti lukema on luokkaa 1-2 ml/min. Kuitenkin vaikka virtausnopeuksien välillä on ero, näiden kahden nestekromatografien välillä, on niiden suuruudet kytköksissä operointipaineeseen. HPLC-laitteisto toimii tyypillisesti 400-600 bar maksimipaineessa, kun UHPLC-laitteistolla maksimipaineet voivat olla jopa 1500 bar. Maksimipaineen suuruus kytkeytyy läheisesti virtausnopeuteen siksi, että se omalta osaltaan rajoittaa virtausnopeuksien suuruutta nestekromatografien välillä. Näiden edellä mainittujen ominaisuus erojen lisäksi UPHLC on toiminnaltaan nopeampi nestekromatografi ja se tarvitsee huomattavasti vähemmän puskuriliuosta.^{36,37}

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia – massaspektrometriassa voidaan menetelmää muokata, UHPLC:n hyödyntämisen lisäksi, myös vaihtamalla massaspektrometrissä olevaa massa-analysointia. Tästä esimerkkinä on UHPLC-QQQ-MS-laitteisto, joka koostuu

ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografista sekä massaspektrometristä, jossa massa-analyssaattorina toimii kolmoiskvadrupoli (kuva 16). UHPLC-QQQ-MS eroaa monista muista LC-MS menetelmistä siinä, että siinä on perinteisen HPLC-nestekromatografian sijasta UHPLC nestekromatografi ja massaspektrometrin monipuolisuutta on parannettu hyödyntämällä kolmoiskvadrupolimassa-analyssaattoria.



Kuva 16. UHPLC-MS laitteiston rakenne ja toimintaperiaate. Kuva muokattu lähteestä.³⁶

UHPLC-QQQ-MS toimii analyysimenetelmänä siten, että UHPLC erottaa näytteessä olevat analyytit toisistaan, jonka jälkeen ionilähde ionisoi ne ennen massa-analyssaattorille siirtymistä. Massa-analyssaattorin, tässä tapauksessa kolmoiskvadrupolin, tehtävänä on erotella ionit toisistaan niiden m/z -arvojen suhteen. Erotteluun voidaan käyttää erilaisia mittaustapoja riippuen analyysin luonteesta, kuten esimerkiksi SIM, SRM ja MRM, joita käsiteltiin tarkemmin luvussa 4.1.2.2. Kun ionit on eroteltu toisistaan niiden m/z -arvojen perusteella, havaitaan nämä ionit lopuksi massaspektrometrin detektorilla. Nestekromatografian eli UHPLC:n tehtävänä on erotella analyytit toisistaan niiden vuorovaikutuksen perusteella, kun näytteen annetaan vaikuttaa nestekromatografian kiinteään faasiin (kolonniin) ja nestefaasiin (liikkuva faasi) kanssa. Nämä vuorovaikutukset perustuvat useisiin mekanismeihin, kuten polariteettiin, ionivuorovaikutukseen sekä ionien koko eroihin. Nestekromatografiassa yleisimmin käytetään käänteisfaasinestekromatografiaa (RPLC, *reversed-phase liquid chromatography*), jossa kiinteä faasi on vähemmän polaarinen mitä nestefaasi, jonka seurauksena ei-polaariset molekyylit absorboituvat kiinteään faasiin, kunnes vielä vähemmän polaarinen nestefaasi kulkee kolonniin läpi. Puolestaan normaalifaasinestekromatografiassa (NPLC, *normal phase liquid chromatography*) kiinteä faasi on polaarinen mitä nestefaasi, kun näyte injektoidaan kolonniin.³⁶

Kuten jo aikaisemmin todettiin, UHPLC-QQQ-MS-laitteistossa, kolmoiskvadrupolin tehtävän on erotella analyytit toisistaan niiden lähtö- ja tuoteionien perusteella. Kolmoiskvadrupoli on laajalti käytetty massa-analysointilaitteisto metabolomiikan sekä fluksomiikan tutkimuksessa. Sen rinnalla käytetään hyvin usein MRM menetelmää, josta puhuttiin tarkemmin luvussa 3.2, jonka avulla voidaan erottaa metaboliitteja hyvin haastavista näyttematriiseista. Kolmoiskvadrupolin etuna on sen korkea herkkyys sekä laaja lineaarisuus, jonka ansiosta sen avulla pystytään analysoimaan hyvin pieniäkin pitoisuuksia eri metaboliitteja. Etuna kolmoiskvadrupolille on lisäksi se, että sen avulla voidaan havaita sekä positiivisesti että negatiivisesti ionisoituneita yhdisteitä. Tämän ominaisuuden ansiosta voidaan analysoida huomattavasti enemmän eri komponentteja erilaisista näytteistä. Kuitenkaan haasteilta ei kolmoiskvadrupolin kanssa vältytä. Itse MRM-menetelmän tekeminen laitteistolle voi olla hyvin haastavaa, koska QQQ vaatii retentioaikojen tarkan määrittämisen kullekin analyyttille, jotta ne voidaan havaita oikeassa aikaikkunassa. Tämä omalta osaltaan hankaloittaa biologisten näytteiden analysointia, koska ne voivat sisältää usein hyvin haastavan näytetaustan.^{38,39}

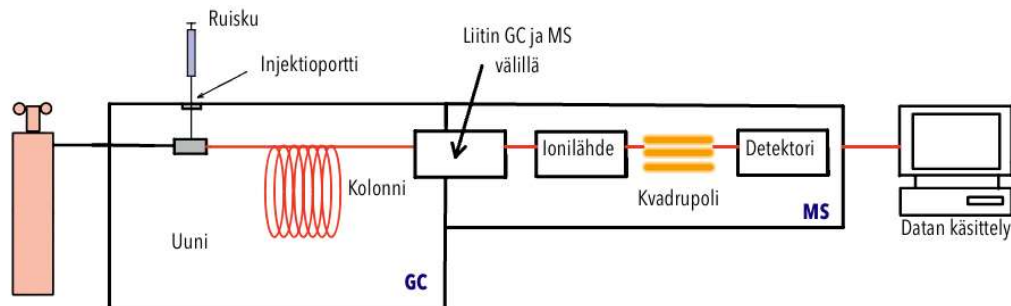
4.3 Kaasukromatografia-massaspektrometria (GC-MS)

Kaasukromatografia-massaspektrometriaa eli GC-MS pidetään yleisesti hyvin monipuolisena analyysimenetelmänä sen kestävyuden, erinomaisen erotuskyvyn, selektiivisyyden, herkkyyden ja toistettavuuden ansiosta. Näiden edellä mainittujen lisäksi GC-MS-laitteiston etuna on sen helppokäyttöisyys (analyysiajan ja käyttökustannusten suhteen) ja sen kyky tuottaa dataa yhdisteiden tunnistamiseksi. GC-MS mahdollistaa monien erilaisten metaboliittien, kuten nopeasti haihtuvien (ketonit, aldehydit, alkoholit, sulfidit ja lipidit), haihtumattomien tai puolihaihtuvien (sokerit, sokerifosfaatit, sokerialkoholit, orgaaniset hapot, aminohapot, peptidit jne.) mittaamisen. GC-MS analytiikassa käytetään yleisimmin kahta eri ionisaatiomenetelmää, jotka ovat elektroni-ionisaatio (EI) ja kemiallinen ionisaatio (CI). Kuitenkin EI on nykypäivänä näistä kahdesta eniten käytetty ionisaatiomenetelmä metabolomiikan sekä fluksomiikan tutkimuksessa.⁴⁰

GC-MS laitteiston toiminta perustuu siihen, että näyteliuosta syötetään (noin 0.1-1 µl) kaasukromatografian injektoriin, jossa näyte höyrystetään ja ohjataan kromatografiseen

kolonniin kantajakaasun avulla (yleensä helium, argon tai vety). Näytemolekyylit erotetaan kolonnissa toisistaan kiinteän faasin ja näytteen välisten vuorovaikutusten avulla. Jotta kaasukromatografilla voidaan saavuttaa korkein mahdollinen resoluutio, tulee sen sisältämä kolonni valita huolellisesti ja sen valinta riippuu paljon analysoitavasta näytteestä. Esimerkiksi kolonnin pituutta lisäämällä voidaan parantaa sen tehokkuutta ja valikoituvuutta, joka soveltuu paremmin erittäin monimutkaisten näytteiden analysointiin. Puolestaan lyhyempää kolonnia voidaan käyttää vähemmän monimutkaisten näytteiden analysoimiseen. Näytteen analysointi perustuu siihen, kuinka siinä olevat yhdisteet vaikuttavat kolonnin kiinteän faasin kanssa, joten näin ollen kolonnin pituudella on merkitystä analysointia ajatellen. Yhdisteiden erottumiseen kolonnissa, kolonnin pituuden lisäksi, vaikuttaa myös paljon niiden rakenne, polaarisuus, kiraaliset ominaisuudet, molekyylin koko sekä niiden höyrystymislämpötila. Eri yhdisteillä on erilaiset vuorovaikutukset kolonnissa käytettävän kiinteän faasin kanssa, mikä aiheuttaa näytteiden eriaikaisen viipymisen kolonnissa. Näin ollen myös kiinteällä faasilla on merkitystä analyysin kulun kannalta, koska sen materiaali myös vaikuttaa yhdisteiden viipymiseen kolonnissa. Näin ollen yhdisteet saapuvat detektorille eri aikoina, jonka perusteella yhdisteet voidaan tunnistaa ja määrittää niiden pitoisuus näytteessä. Yhdisteiden kulkemaa aikaa, kolonnin läpi kohti detektoria, kutsutaan retentioajaksi (RT, *retention time*).⁴⁰⁻⁴²

Kun yhdisteet kulkevat GC-MS-laitteistossa kolonnin läpi, saapuvat ne detektorille eli massaspektrometrille havaittavaksi. Massaspektrometrille saapuessaan yhdisteet ionisoidaan ionilähteen avulla. Kuten jo aikaisemmin todettiin, EI on nykypäivänä eniten käytetty ionisaatiomenetelmä GC-MS analytiikassa, joten tarkastellaan sitä hieman tarkemmin GC-MS-laitteiston ionisaatiolähteenä. EI on niin kutsuttu ”kova” ionisaatiomenetelmä, jossa molekyyliä pommitetaan elektronisuihkulla, joka saa molekyylit ionisoitumaan sekä fragmentoitumaan. Kun ionisoidut molekyylit ja fragmentit on saatu muodostettua, ohjataan ne ionisaatiolähteeltä kohti massa-analysointia. Yleensä GC-MS analytiikassa massa-analysointina käytetään joko Q-massa-analysointia. Massa-analysointia tehtävänä on erottaa ionisoidut molekyylit sekä fragmentit toisistaan niiden m/z -arvojen suhteen. Erottelun jälkeen havaituista m/z -arvoista muodostetaan kromatogrammi, josta voidaan analysoida mitä yhdisteitä näyte sisältää ja kuinka paljon (kuva 17).⁴¹



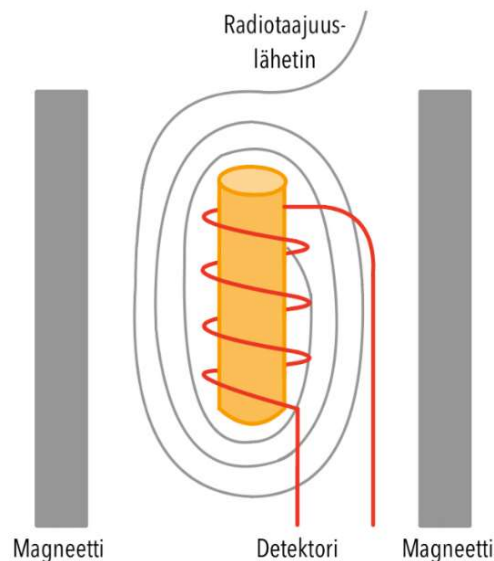
Kuva 17. GC-MS-laitteiston rakenne.

4.4 Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia (NMR)

NMR eli ydinmagneettinen resonanssispektroskopia on hyvin yleisesti käytetty analyysimenetelmä metabolomiikassa ja sen tutkimuksessa massaspektrometrian lisäksi. Ydinmagneettista resonanssispektroskopiaa hyödynnetään paljon biologisten makromolekyylien rakenteen, dynamiikan sekä vuorovaikutusten tutkimukseen. Biologisten analyysien lisäksi NMR:aa hyödynnetään laajalti muilla tieteen osa-alueilla, kuten kemiassa, fysiikassa sekä lääketieteessä. Vaikka nykypäivänä massaspektrometria on johtavassa asemassa metabolomiikan tutkimuksessa, on NMR:lla monia hyviä ominaisuuksia ja etuja MS:aan verrattuna. NMR:an avulla voidaan tarkastella runsaampia yhdisteitä nesteistä, soluutuksista sekä kudoksista ilman näytteiden monimutkaista valmistelua ja fragmentointia, toisin kuin massaspektrometriassa. NMR tarjoaa mahdollisuuden analysoida yhdisteitä, joita on vaikea ionisoida tai ne vaativat derivatisointia MS:lle. Sen avulla voidaan tunnistaa yhdisteitä, joilla on sama massa, mukaan lukien ne, joilla on erilainen isotopomeerijakauma. NMR soveltuu erinomaisesti tuntemattomien yhdisteiden rakenteiden määrittämiseen ja hyödyntämällä stabiileja isotooppileimoja, voidaan analysoida aineenvaihduntareittien sekä metaboliittien muodostuksen dynamiikkaa ja mekanismeja.^{43,44}

Kuten jo aikaisemmin todettiin, NMR:aa hyödynnetään paljon yhdisteiden rakenteen, dynamiikan ja vuorovaikutusten tutkimiseen. NMR-laitteisto koostuu suprajohtavista magneeteista, radiotaajuuslähettimestä sekä detektorista ja sen toiminta perustuu siihen, kuinka

aktiivisten atomien ytimet käyttäytyvät magneettikentässä, kun näytteeseen kohdistetaan radiotaajuista säteilyä (kuva 18). Käytännössä NMR-analyysissä nestemäinen näyte lisätään näyteputkeen, joka asetetaan NMR-spektrometrin näytekammioon. Näytekammio on täytetty nestemäisellä heliumilla ja näytekammiota ympäröi suprajohtavat magneetit. Näytteessä ydinhiukkasten pariton määrä saa aikaan atomille ydinspinin, jonka yhteisvaikutuksesta ytimen varauksen kanssa syntyy magneettikenttä. Jos näytettä ei ympäröisi ulkoinen magneettikenttä, olisi atomien ytimet suuntautuneet satunnaisesti eri suuntiin. Koska näytettä ja sen atomien ytimiä ympäröi ulkoinen magneettikenttä, saa se aikaan sen, että osa ytimistä asettuu ulkoisen magneettikentän suuntaisesti ja osa sen vastaisesti. Kentän suuntaisilla ytimillä on jonkin verran alempi energia kuin kenttää vastaan suuntautuneilla ytimillä. Tämän lisäksi ytimet voivat siirtyä perusenergiatilaltaan korkeammalle tai matalammalle energiatilalle. Kun ytimet ovat suuntautuneet ulkoisen magneettikentän vaikutuksesta, joko kentän suuntaisesti tai sitä vastaan, kohdistetaan näytteeseen radiotaajuista sähkömagneettistasäteilyä. Säteilyä kohdistetaan näytteeseen lyhytkestoisten RF-pulssien avulla, jonka atomien ytimet ensin absorboivat ja sitten emittoivat. Säteily saa aikaan sen, että ytimien spinit vaihtavat suuntaa eli ytimet virittyvät energiatiloilta toisille, kun ytimet absorboivat säteilyä. Kun nämä viritystilat purkautuvat, havaitsee näytteen ympärillä oleva detektori purkautumisessa emittoituvan säteilyn määrän.⁴⁵



Kuva 18. NMR-laitteisto, jossa kuvattuna näytekammio/näyte, jota ympäröivät suprajohtavat magneetit, radiotaajuuslähetin ja detektori.

NMR-spektroskopiassa on kaksi yleisintä niin kutsuttua lajia orgaanisten yhdisteiden rakenteen kuvaamiseen, ja ne ovat ^1H -NMR ja ^{13}C -NMR. Näiden kahden lisäksi on myös olemassa ^{15}N -NMR ja ^{31}P -NMR lajit, mutta niitä ei käytetä niin yleisesti mitä ^1H -NMR ja ^{13}C -NMR. Ero ^1H -NMR ja ^{13}C -NMR lajin välillä on se, että ^1H -NMR käytetään määrittämään molekyylin vetyatomien lukumäärää, kun puolestaan ^{13}C -NMR molekyylin hiiliatomien lukumäärän määrittämiseen. Koska NMR:n avulla voidaan havaita ainoastaan ytimiä, joilla on pariton massaluku, soveltuvat nämä edellä mainitut tekniikat hyvin orgaanisten yhdisteiden analysointiin. NMR:n avulla voidaan muodostaa orgaanisten yhdisteiden hiilivety runko ja yhdessä esimerkiksi IR avulla voidaan määrittää yhdisteen funktionaaliset ryhmät ja MS avulla yhdisteen moolimassa. Metabolomiikan tutkimuksessa ^1H -NMR on kaikkein eniten käytetty tekniikkaa verrattuna ^{13}C -NMR tekniikkaan, koska sen herkkyys on kaikista parhain.²

KOKEELLINEN OSA

5. Työn tarkoitus

Kokeellisen osan tarkoituksena oli perehtyä ihmisen sekä hiiren lihassolunäytteiden soluviljelyyn, näytteiden keräykseen sekä näytteiden analysointiin UHPLC-QQQ-MS-laitteistoa hyödyntäen. Tutkimuksessa perehdyttiin syvemmin, kuinka lihassolujen aineenvaihduntareitit tuottavat tiettyjä kiinnostuksen kohteena olevia aminohappoja sekä kuinka nopeasti ne tuottavat niitä tietyissä aikapisteissä. Näytteiden analysoinnin osalta tutkimuksessa keskityttiin ensin optimoimaan UHPLC-MS/MS-menetelmää kuoppatestin sekä aikapistevertailun avulla. Kun menetelmä oli saatu optimoitua mittauksiin sopivaksi, analysoitiin ihmisen lihassolunäytteistä aineenvaihduntareittien virtausnopeutta eli fluksomiikkaa. Fluksomiikan tutkimisessa hyödynnettiin isotooppileimausta, jossa ihmisen lihassolujen annettiin vaikuttaa ¹³C-isotooppileimatun glukoosiliuoksen kanssa eri aikapisteiden verran. Isotooppileimattuja glukoosiliuoksia valmistettiin kokeellista osaa varten kahta erilaista, joissa niiden pitoisuudet säädettiin HS (*horse serum*) - ja FBS (*fetal bovine serum*) -seerumien avulla 2 ja 20 prosenttiseksi. Eri seerumipitoisten glukoosiliuosten tarkoituksena oli stimuloida ihmisen lihassolujen aineenvaihduntareittejä ja tarkoituksena oli analysoida, onko isotooppileimatun glukoosiliuoksen väkevyydellä merkittävää vaikutusta aminohappojen tuotantoon.

6. Näytteiden ja liuosten valmistus

6.1. Kasvatus- ja erilaistusmediumien valmistus

Tämän tutkimuksen kokeellinen osa aloitettiin valmistamalla kasvatusmedium (GM, *growth medium*) ja erilaistusmedium (DM, *Differentiation medium*), jotka olivat oleellinen osa soluviljelyä. GM ja DM säilyvät hyvänä n. 3 viikkoa, joten niiden valmistusmäärä suhteutettiin sen mukaan, kuinka paljon mediuumeita tarvittiin sen säilyvyysaikana. Molemmat liuokset sisälsivät samat ainesosat, mutta FBS (*Fetal bovine serum*) prosenttiosuus liuoksen tilavuudesta

vaihteli kasvatus- ja erilaistusmediumien välillä. GM ja DM liuoksiin tarvittavat ainesosat ja niiden määrät suhteessa DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) määrään on esitetty taulukossa 3. DMEM on pohja mediumliuoksille ja sen mitattu tilavuus ratkaisee, kuinka paljon muita mediumin valmistukseen tarvittavia ainesosia tulee mitata. GM ja DM liuoksia valmistettiin soluviljely kerran mukaan siten, että DMEM määrä oli tilanteesta riippuen 25-40 ml.

Taulukko 3. GM ja DM liuosten tarvittavat aineosat ja niiden prosenttiosuudet DMEM tilavuuteen nähden

GM	DM
DMEM (Lonza™, #BE12-614Q)	DMEM (Lonza™, #BE12-614Q)
10 % FBS (Gibco, #10270-106)	5 % FBS (Gibco, #10270-106)
1 % L-glutamiini (Lonza™, #BE17-605E)	1 % L-glutamiini (Lonza™, #BE17-605E)
1 % P/S (Gibco, #15140-122)	1 % P/S (Gibco, # (15140-122)

DMEM on yksi perusmediumeista, joita voidaan käyttää GM tai DM liuoksen valmistuksessa. Käytettävä solulinja ja käyttökohde määrittävät mitä perusmediumia käytetään. Tässä tutkimuksessa käytettiin DMEM perusmediumia liuosten valmistuksessa, koska se oli solulinjaa ja käyttökohdetta ajatellen parhain. Kuten aiemmin todettiin, DMEM perusmediumia ei voida käyttää yksinään kasvatus- tai erilaistusmediumina, vaan siihen tulee lisätä taulukossa 3 olevia seerumia (FBS), antibiootteja (P/S) sekä L-glutamiinia tilanteen mukaan. Seerumi sisältää tekijöitä, jotka edesauttavat solujen kasvamista, jakautumista sekä kiinnittymistä, antibiootit puolestaan estävät bakteerikontaminaatioita ja L-glutamiini on tärkeä aminohappo, joka toimii energialähteenä solujen lisääntymiselle.

6.2 Soluviljelmien ylläpito

Soluviljely oli osa näytteiden valmistusta ja siitä alkoi koko analysointiprosessi kohti valmiiden näytteiden mittausta, kun aikaisemmassa luvussa tehdyt medium liuokset oli saatu valmistettua. Soluviljelyn avulla soluja kasvatettiin haluttuun määrään asti, jotta niitä voitiin erilaistaa jatkoprosessia varten. Soluviljely perustuu siihen, että eläimestä, ihmisestä tai kasvista irrotetaan kudosta tai elintä, joita kasvatetaan keinotekoisessa, kasvua tukevassa ympäristössä. Soluviljelyssä viljelmää ylläpidettiin muoviastiassa, jossa solut vaikuttivat kasvatusmediumin kanssa. Riippuen kuinka kauan soluja haluttiin kasvattaa, tuli kasvatusmediumia (GM, *growth medium*) vaihtaa sekä soluja jakaa sen mukaan, jotta solut mahtuivat jakautumaan astiassa sekä ne saivat tarpeeksi tarvittavia ravintoaineita elääkseen ja kasvaakseen. Kun soluja oli saatu kasvatettua soluviljelyn avulla tarpeeksi, siirryttiin soluja erilaistamaan erilaistusmediumin (DM, *differentiation medium*) avulla. Erilaistusmediumin avulla kasvatetut solut erilaistettiin myotuubeiksi, jotka olivat tämän tutkimuksen osalta oleellisia.

Soluviljely poikkesi muista laboratoriotekniikoista siinä, että soluviljelytiloissa pyrittiin säilyttämään aseptiikka (aseptisella tekniikalla tarkoitetaan steriilisyöskentelyä, jolla pyritään estämään kontaminaatioita). **Kaiken materiaalin, joka oli suoraan kosketuksessa soluviljelmän kanssa, tuli olla steriili. Soluviljely tuli suorittaa aina laminaarikaapissa, kaikki pinnat (etenkin laminaarikaapin työskentelyalusta, ennen ja jälkeen soluviljelyn) sekä työskentelyvälineet (automaatti-/täyspipetit, mittapipetit, reagenssipullot sekä astiat) tuli puhdistaa aina 70 % etanolilla.** Soluviljelyssä optimaalisena kasvulämpötilana pidetään 37 °C, joten reagenssit tuli käytön mukaan lämmittää vesihautessa kyseiseen lämpötilaan, jotta olosuhteet olivat optimaaliset soluviljelmiä käsiteltäessä. Tämän lisäksi soluviljelmää pyrittiin pitämään ulkona inkubaattorista, jossa tasainen lämpötila, CO₂-pitoisuus ja kosteus, mahdollisimman lyhyen aikaa.

Soluviljelmä vaati kasvatusmediumin vaihtamista säännöllisesti, kun solut jakaantuivat solumaljalla/-pulloissa (konfluenssi 50–60 %) ja tätä prosessia kutsuttiin siirrostukseksi. Siirrostus tapahtui sille tehdyn ohjeistuksen mukaisesti. Soluviljelmän käsittely, eli siirrostus, aloitettiin aina siten, että soluviljelmä mikroskopoitii ja tarkistettiin, että solut olivat kasvaneet

riittävästi ja ettei silmin nähtäviä kontaminaatioita havaittu. Mikroskopoinnin jälkeen siirryttiin käsittelemään soluviljelmä laminaarikaapissa.

Siirrostus aloitettiin imemällä vanha GM liuos varovaisesti pasteur-pipetillä solupullosta siten, että pyrittiin olla osumatta solujen kasvualustaan. Kun vanha GM oli saatu poistettua, huuhdeltiin solut 10 ml fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS, *phosphate buffered saline*). Huuhtelun jälkeen PBS imettiin pois varovasti solupullon pinnalta, välttämällä koskemista solujen kasvualustaan. Pesun jälkeen solupulloon lisättiin 3 ml 0,25 % trypsiini + EDTA-liuosta ja inkuboitiin solupulloa 6 minuuttia (trypsiinin tarkoituksena on irrottaa solut kasvualustasta). Kun solut olivat olleet 6 minuuttia inkubaattorissa (37 °C), tarkistettiin mikroskoopin avulla, että solut ovat irronneet kasvualustasta. Tämän jälkeen siirryttiin inhiboimaan solupulloon lisätty 0,25 % trypsiini laminaarikaapissa lisäämällä solupulloon 7 ml GM. Lisäyksen yhteydessä soluja suspensoitiin GM avulla imemällä suspensioliuosta mittapipettiin ja valuttaen liuosta solupullon seinämiä pitkin 5 kertaa sekä 10 kertaa siten, että suspensiota imettiin ja tyhjennettiin mittapipetin avulla solupullon kulmassa. Kun solut saatiin suspensoitua GM kanssa, siirrettiin suspensio 50 ml falcon-putkeen ja suspensioita sentrifugoitiin 3 minuuttia 1200 rpm huoneenlämmössä. Sentrifugoinnin jälkeen falcon-putki putsattiin 70 % etanolilla ennen laminaarikaappiin siirtämistä, jossa neste poistettiin, varovasti imemällä, pohjaan painuneen solupelletin päältä. Tämän jälkeen lisättiin solupellettiin automaattipipetillä 1 ml GM ja suspensoitiin liuosta 10 kertaa. Suspensoinnin jälkeen lisättiin falcon-putkeen loput 9 ml GM ja sekoitettiin vielä muutamia kertoja pipetillä pumpaten. Taulukossa 4 esitetty siirrostuksessa käytetyt reagenssit ja niiden valmistajat.

Taulukko 4. Soluviljelyn siirrostuksessa käytetyt reagenssit ja niiden valmistajat

Reagenssi	Valmistaja
PBS	Gibco, (#ref 10010-015)
0,25 % trypsiini + EDTA	Santa Cruz, (#ref sc-391060)

Kun uusi GM oli saatu lisättyä solujen sekaan, otettiin 2 kertaa automaattipipetillä 0,1 µl suspensioliuosta ja siirrettiin se hemosytometriin (C-chip), jonka avulla laskettiin solut näytteessä solulaskurilla (laite ilmoittaa tuloksen solua/ml). Solujen määrä näytteessä lasketaan

kahden rinnakkaisen tuloksen keskiarvona ja saadun tuloksen avulla voidaan määrittää, kuinka paljon suspensiota tulee mitata uusiin solupulloihin. Uuteen solupulloon asetetaan soluja siten, että soluja on n. 150 000 kappaletta/solupullo. Mitattava suspension määrä laskettiin kaavan 1 avulla.

$$V = \frac{\textit{haluttu solumäärä uuteen solupulloon}}{\textit{laskettu solumäärä}} \quad (1)$$

Alla esimerkki lasku suspension mittatilavuuden laskemisesta, kun solujen määrän haluttiin olevan 150 000 solua/solupullo. Laskuissa ei tarvitse ottaa huomioon uuden solupullon pinta-alaa, kun solujen määrä suspensiossa laskettu solulaskurissa.

$$V = \frac{150\,000 \text{ solua}}{1,67 \times 10^5 \text{ solua/ml}} = 0,898 \text{ ml} = 898 \mu\text{l}$$

Suspensiota mitattiin uuteen solupulloon laskettu määrä ja lisättiin GM siten, että solupullon kokonaisliuostilavuus on 20 ml. Kun siirrostus oli tehty onnistuneesti, solupullot siirretään inkubaattoriin kasvamaan, jossa olosuhteet 37 °C ja 5 % CO₂.

Siirrostuksen jälkeen, kun solut oli kasvatettu haluttuun solumäärään asti, siirryttiin soluja erilaistamaan DM liuoksen avulla. Soluja kasvatetaan yleensä johonkin tiettyyn siirrostuslukuun saakka, jonka jälkeen ne käsitellään DM liuoksella ja annetaan kasvaa erilaistusliuoksen avulla haluttuun muotoon (tutkimuksen näkökulmasta lihassoluista haluttiin erilaistaa myotuubeja). Erilaistuksessa soluja käsiteltiin samalla tavalla kuin siirrostuksessa, mutta erona on se, että **GM liuoksen sijasta käytettiin DM liuosta** ja solut viljeltiin kuusi kuoppalevyille solupullojen sijaan.

6.3 Näytteiden valmistus

Aiemmassa luvussa perehdyttiin soluviljelyyn ja kuinka soluviljelmistä voidaan kasvattaa ja erilaistaa soluja haluttuun määrään ja muotoon. Tässä luvussa käydään läpi, kuinka näistä kasvatetuista ja erilaistetuista lihassoluista valmistettiin lihassolunäytteet massaspektrometrille, jotta ne soveltuivat laitteella mittaamiseen myöhäisemmässä vaiheessa. Kuten aiemmin jo todettiin, soluja voitiin kasvattaa solupulloissa GM liuoksen avulla tai erilaistaa niitä kuoppalevyillä, jossa niiden annettiin vaikuttaa DM liuoksen kanssa. Lihassolunäytteiden valmistuksen kannalta juuri solujen erilaistaminen oli tärkeässä roolissa. Kun solut oli saatu erilaistettua haluttuun muotoon, voitiin soluja jatkokäsitellä ja valmistaa niistä näytteet, jotka soveltuivat massaspektrometrillä mittaamiseen.

Lihassolunäytteet valmistettiin tutkimusta varten siten, että kuoppalevyille erilaistettujen solujen annettiin vaikuttaa inkubaattorissa, ^{13}C -isotooppileimatus glukoosiliuoksen kanssa, eri aikapisteiden verran. Tiettyjen aikapisteiden jälkeen solut kerättiin kuoppalevyiltä ja niistä valmistettiin näytteet viinilasimuotoisiin kromatografiapulloihin (wine-glass shaped, Micro-V vials, 1500 μl , Agilent). Itse näytteiden keräys suoritettiin siten, että kuoppalevyt siirrettiin inkubaattorista jäällä täytettyyn astiaan ja kuopista imettiin ^{13}C -isotooppileimattu glukoosiliuos varovasti, samalla kuoppalevyä kallistaen, jotta imupipetti ei olisi kontaktissa kuoppalevyn pohjan kanssa, johon solut olivat kiinnittyneet. Kun ^{13}C -isotooppileimattu glukoosiliuos saatiin imettyä pois kuoppalevyiltä, pestiin solut 2 kertaa 1 ml kylmää 0,9 % NaCl-liuosta (pesuliuos imettiin samalla tavoin pois kuin glukoosiliuos). Pesujen jälkeen kuoppalevyn kuoppiin lisättiin n. 15 ml nestemäistä typpeä ja annettiin sen haihtua (nestemäisen typen tarkoituksena oli pysäyttää solujen aineenvaihdunta). Nestemäisen typen haihtumisen jälkeen kuopille lisättiin 500 μl metanoli-vesiliuosta (liuoksen suhde 80 % metanolia 20 % vettä). Metanoli-vesiliuos lisäyksen jälkeen kuoppien pohjia raaputettiin n. 30 sekuntia muovikärkisellä raaputtimella, jotta solut irtoavat kuopan pohjasta liuoksen sekaan. Raaputuksen jälkeen kuopista pyrittiin keräämään kaikki neste eppendorf-putkiin automaattipipetin avulla sekä nesteen keräyksessä yhteydessä validoitiin, kuinka monta kuoppaa haluttiin kerätä kutakin näytettä kohden. Kun näytteet oli saatu kerättyä eppendorf-putkiin, sentrifugoitiin niitä 20 minuuttia olosuhteissa, jossa pyörimisnopeus oli 16000 G ja lämpötila 4 °C. Sentrifugoinnin jälkeen eppendorf-putkista

pyrittiin keräämään supernatantti kromatografiapulloihin siten, että pohjalle jäisi ainoastaan sentrifugoinnissa sinne painunut proteiinipelletti.

Kun solunäytteet oli saatu kerättyä kromatografiapulloihin, siirryttiin kuivaamaan näytteet typpihaihduttimella. Typpihaihdutuksen tarkoituksena oli haihduttaa metanoli-vesiliuos metaboliittien ympäriltä, jotta varsinaiset näytteet voitiin pakastaa $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pakastimeen odottamaan mittauksia massaspektrometrillä. Ennen varsinaista mittausten tekemistä massaspektrometrillä näytteet siirrettiin $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pakkasesta $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ pakkaseen. Kun oli aika mitata näytteet massaspektrometrillä, näytteet siirrettiin $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ pakkasesta jäähtymään huoneenlämpöön. Tämän jälkeen valmistettiin liuotin näytteitä varten, joka sisälsi 50 % ACN ja 50 % H_2O . Kun liuotin oli saatu valmistettua, liuotettiin kuivatut näytteet mittaustilanteen mukaan 40–400 μl liuotinta. Näytteiden valmistuksessa käytetyn liuottimen määrä riippui, kuinka monta kertaa yhdestä näytteestä haluttiin mittauksia tehdä UHPLC-QQQ-MS-laitteella kullakin mittauskerralla (UHPLC injektoi yhdellä mittauskerralla 3 μl näytettä, joten mitattava liuottimen määrä näytettä kohden tuli laskea tämän mukaan, jotta laite pystyi injektoimaan näytettä riittävän monta kertaa). Lopuksi tuli varmistaa, että metaboliitit varmasti sekoittuvat kromatografiapullossa liuottimeen, joten jokaista näytettä vorteksoitiin 30 sekuntia ennen mittauksia UPHLC-QQQ-MS-laitteistolla.

Varsinaisten näytteiden lisäksi tuli myös valmistaa standardinäyte (QC, *quality control*) sekä nollanäyte (*blank*) mittauksia varten. Blank-näyte valmistettiin kromatografiapulloon 50:50 suhteessa 100 % ACN ja 100 % H_2O . Standardinäytteet puolestaan tehtiin valmiista standardiliuoksista ja niiden konsentraatio määräytyi sen mukaan, mitattiinko näytteitä positiivisella vai negatiivisella polarisaatiolla. Negatiivisella polarisaatiolla mitattaessa käytettiin konsentraatioiltaan 1–90 μM standardeja ja positiivisella 10–900 μM . Valmista standardiliuosta otettiin mittaustilanteen mukaan 70–100 μl . Mittaustilanteissa mitattava standardiliuoksen määrä riippui siitä, kuinka monta kertaa standardia haluttiin mitata mittausten aikana (UHPLC injektoi yhdellä mittauskerralla 3 μl). Standardiliuokset sisälsivät liitteessä 1 esitetyt reagenssit ja ne oli valmistettu siten, että reagenssien konsentraatiot liuoksessa vastasivat standardiliuosten konsentraatiota. Taulukossa 5 on esitetty mittauksissa käytettyjen valmiiden standardiliuosten konsentraatiot kummallekin polarisaatiolle.

Taulukko 5. Valmiit standardiliuokset ja niiden konsentraatiot positiiviselle ja negatiiviselle polarisaatiolle

Standardiliuoksien konsentraatiot (pos.)	Standardiliuoksien konsentraatiot (neg.)
10 μM	1 μM
50 μM	2,5 μM
125 μM	5 μM
250 μM	10 μM
500 μM	25 μM
900 μM	50 μM
	90 μM

Kun näytteet sekä standardi- ja nollanäytteet oli saatu valmistettua, voitiin ne siirtyä mittamaan UHPLC-QQQ-MS-laitteistolla. Näytteet analysoitiin UHPLC-QQQ-MS-laitteistolla siten, että alkuun injektoitiin QC-näyte 8 kertaa, jonka jälkeen mitattiin biologiset näytteet satunnaisessa järjestyksessä siten, että jokaisen 8. näytteen jälkeen yksi QC-näyte. Näyte ajon lopuksi analysoitiin vielä kertaalleen QC-näyte sekä nollanäyte.

6.4 Puskuriliuosten valmistus

Soluviljelyn ja näytteiden valmistuksen lisäksi, tutkimuksessa tuli valmistaa puskuriliuokset A ja B, joita käytettiin mittausten aikana näytteitä analysoitaessa. Puskuriliuokset tuli valmistaa tarkasti ohjeiden mukaan, jotta mittauksissa voitiin saavuttaa mahdollisimman toistettavia sekä luotettavia mittaustuloksia. Puskuriliuosten valmistuksessa ja kaikissa sen vaiheissa oli erityisen tärkeää käyttää MS-laatuisia liuottimia. Puskuriliuokset A ja B valmistettiin 150 mM ammoniumbikarbonaatti kantaliuoksesta seuraavasti:

Puskuriliuos A: 15 mM ammoniumbikarbonaatti vedessä, pH= 9,00

Puskuriliuos B: 15 mM ammoniumkarbonaatti 90 % ACN/10 % H₂O liuoksessa, pH=9,00

Ennen puskuriliuosten valmistusta, tuli valmistaa 150 mM ammoniumbikarbonaatti kantaliuos. Kantaliuos valmistettiin 200 tai 500 ml mittapulloon ja sen valmistus aloitettiin punnitsemalla 3,718 g ammoniumbikarbonaattia ja liuotettiin se joko 170 tai 470 ml vettä dekantterilasissa magneettisekoittajalla samalla sekoittaen. Kun ammoniumbikarbonaatti oli liennut veteen, mitattiin liuoksen pH magneettisekoittajalla sekoittaen. Liuoksen pH:ksi tuli saada 9,00, joten sitä säädettiin lisäämällä liuoksen 28 % ammoniumhydroksidia pasteur-pipetillä. Kun pH oli saatu asetettumaan halutulle tasolle, siirrettiin liuos 200 tai 500 ml mittapulloon ja täytettiin se merkkiin asti vedellä. Merkkiin täytön jälkeen kantaliuosta sonikoitiin ultraäänihautteessa 20 minuuttia tai niin kauan, että kaikki kiinteä sakka liennut. **Valmista kantaliuosta tulee säilyttää jääkaapissa.**

Kun kantaliuos oli saatu tehtyä, siirryttiin valmistamaan puskuriliuokset A ja B. Puskuriliuos A valmistettiin siten, että kantaliuosta otettiin 25 ml, lisättiin kantaliuos 250 ml mittapulloon ja täytettiin se merkkiin asti vedellä. Merkkiin asti täytön jälkeen puskuriliuos A:ta ultrasonikoitiin 20 minuuttia, jonka jälkeen se suodatettiin Wulffin pulloa sekä suodatinsysteemiä ja -paperia käyttäen (suodatinpaperina käytettiin whatman 42). Puskuriliuos B valmistettiin ottamalla 50 ml ammoniumbikarbonaatti kantaliuosta ja siirtämällä se 500 ml mittapulloon sekä täyttämällä se merkkiin asti asetonitriilillä. Puskuriliuos B muodosti asetonitriilillä merkkiin täyttäessä valkoista sakkaa mittapulloon, joten oli erityisen tärkeää, että liuosta ultrasonikoitiin riittävästi. Ultrasonikointi tehtiin vähintään 20 minuuttia (pidempään ellei sakka liukene), jonka jälkeen liuos suodatettiin samalla tavoin kuin puskuriliuos A. Puskuriliuokset siirrettiin suodatuksen jälkeen niille tarkoitettuihin liuospulloihin.

7. Käytetyt laitteet ja menetelmät

Tutkimuksessa näytteen analysointi suoritettiin UPHLC-QQQ-MS-laitteistoa hyödyntäen, jossa nestekromatografina toimi *Agilent Technologies 1290 Infinity*, massaspektrometrinä *Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS*. Laitteessa käytettiin ionilähteenä Agilent Jet Stream (AJS) sähkösumutus-ionisaatiolähdettä. Kuivauskaasuna mittauksissa käytettiin typpeä (N_2), joka tuotettiin typpigeneraattorilla. Törmäyskaasuna käytettiin myös typpeä, joka johdettiin laitteeseen kaasupullosta (N_2 5.0). Näytteen mittauksissa hyödynnettiin

kohdennettua analytiikkaa ja metaboliitteja analysoitiin MRM:n avulla. Taulukossa 6 on esitetty UHPLC-QQQ-MS mittauksissa käytetyt laiteparametrit.

Taulukko 6. Mittauksissa käytetyt laiteparametrit

Laiteparametri	Arvo
Nebulizer	50 psi
Drying gas	13 l/min
Sheat gas temp	350 °C
Sheath gas flow	12 l/min
Vcap	3000 V
Acquistition time	1 spectra/s
Measurement time	10 min + 1 min post-time
Polarization	+/-

UHPLC-menetelmässä kolonnina käytettiin Watersin AtlantisTM Premier BEH Z-HILIC (1.7 μm , 2.1 x 100 mm), esikolonnina VanGuardTM Fit ja kolonnin lämpötilana 40 °C. Näytevirtauksena käytettiin 0,7 ml/min ja injektiotilavuutena 3 μl . Tutkimuksessa näyteajossa käytettiin 10 minuutin gradienttia, joka koostui seuraavasti: aluksi ajettiin luottimia suhteessa A 10 %/ B 90 % 1 minuutin ajan, jonka jälkeen liuotinsuhde muutettiin lineaarisesti seuraavan 5 minuutin aika niin, että lopuksi liuotinsuhde oli A 35 % ja B 65 %. Tämän viiden minuutin jälkeen siirryttiin liuotinsuhdetta nostamaan lineaarisesti niin, että 2 minuutin jälkeen liuotinsuhde oli A 10 % ja B 90 %. Gradientin lopuksi liuotinsuhdetta A 10 % ja B 90 % pidettiin 2 minuuttia ennen seuraavaa injektiota.

Tutkimuksen tarkoituksena oli määrittää aminohappoja lihassolunäytteistä UPHLC-QQQ-MS-laitteistoa hyödyntäen. Analysoitavana olevat aminohapot olivat alaniini, asparagiini, aspartaatti, glutamaatti, glutamiini, glysiini, proliini ja seriini. Näitä edellä mainittuna aminohappoja analysoitiin biologisista näytteistä useiden reaktioiden seurannalla eli MRM avulla. MRM tarkoituksena oli analysoida aminohappoja niille asetetuissa aikaikkunoissa, niiden lähtö- ja tuoteionien perusteella. Tutkimuksessa aminohapoille määritetyt retentioajat

olivat isossa roolissa tulosten oikeellisuuden kannalta. Tästä seuraten ennen varsinaisten näytteiden analysointia, tuli retentioajat määrittää standardien avulla jokaisen mittaus kerran yhteydessä. Tällä varmistettiin, että menetelmän avulla voitiin analysoida luotettavia tuloksia ja metaboliitit voitiin havaita niille asetetuissa aikaikkunoissa. Molemmille sekä positiiviselle, että negatiiviselle polarisaatiolle mitattiin omat standardit, riippuen kummalla polarisaatiolla mitattiin ensin itse näytteitä. Negatiivisille polarisaatioille käytettiin 25 μM standardia ja positiiviselle 50 μM . Riippuen mittaustilanteesta ja kuinka monta kertaa standardia mitattiin mittausten aikana, standardia pipetoitiin viinilasin muotoiseen kromatografiapulloon 40–100 μl (UHPLC injektioi näytettä 3 μl /mittauskerta). Retentioaikojen muokkaamiseksi menetelmään, standardi mitattiin 5 kertaa ja retentioajat muokattiin aina viidennen rinnakkaismittauksen mukaan. Kuitenkin ennen standardien ja varsinaisten näytteiden mittauksia tuli huolehtia, että kolonnin tasapainotettiin riittävästi noin 0,5-2 tuntia. Kolonnin riittävän tasapainottamisen avulla pyrittiin välttämään tutkittavien aminohappojen retentioaikojen ”driftaamista” eli välttämään ettei analysoidut aminohapot vaeltaisi ohi niille asetetusta aikaikkunasta.

Kun retentioajat oli saatu muokattua standardinäytteiden avulla, siirryttiin mittaamaan biologiset näytteet. Kuten jo aikaisemmin mainittiin, näyteajat suoritettiin UHPLC-QQQ-MS-laitteistolla siten, että ensin analysoitiin 8 kertaa QC-näyte, jonka jälkeen biologiset näytteet analysoitiin satunnaisessa järjestyksessä siten, että joka 8. näyte oli QC-näyte. Analyysin lopuksi mitattiin vielä yksi QC- ja nollanäyte. Mittauksissa käytettiin taulukon 7 mukaisia siirtymiä eli lähtö- ja tuoteioneja kullekin aminohapolle. Mittausten tarkoituksena oli analysoida biologisista näytteistä aminohappoja ja niiden eri isotopologeja. Jokaiselle isotopologille oli määritetty yksi tai useampi siirtymä, joiden perusteella pyrittiin havaitsemaan aminohappojen isotopologeja näytteistä.

Yleensä näytemittaukset suoritettiin kahden mittauspäivän aikana siten, että toinen päivästä käytettiin negatiivisen polarisaation mittauksiin ja toinen positiivisen. Laitteisto pyrittiin pitämään käynnissä ja kolonni tasapainossa mittauspäivien välissä, hyödyntämällä näyteajojen päätteeksi niin sanottua stop-menetelmää. Tässä menetelmässä virtausta laskettiin, kolonnin pestiin näytteiden jäljiltä puhtailla liuottimilla sekä jätettiin ne virtamaan tiettyssä suhteessa, kuten 95 % ACN/ 5 % H₂O, virtausnopeudella 0,05 ml/min yön ajaksi.

Taulukko 7. Analyysimenetelmään määritellyt aminohapot ja niiden isotopologien lähtö- ja tuoteionit

Aminohappo	M+0	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5	M+6
Alaniini	90/44	91/44 91/45	92/45 92/46	93/46			
Asparagiini	133/74	134/74 134/75	135/74 135/75 135/76	136/75 136/76	137/76		
Aspartaatti	134/74	135/74 135/75	136/74 136/75 136/76	137/75 137/76	138/76		
Glutamaatti	148/84	149/84 149/85	150/85 150/86	151/86 151/87	152/87 152/88	153/88	
Glutamiini	147/84	148/85	149/86	150/87	151/88	152/88	
Glysiini	76/30	77/30 77/31	78/31				
Prolini	116/70	117/70 117/71	118/71 118/72	119/72 119/73	120/73 120/74	121/74	
Seriini	106/60	107/61	108/62	109/62			

8. Tulokset ja johtopäätökset

Kokonaisuudessaan tutkimuksen kokeellinen osa koostui soluviljelystä ja -keräyksestä, menetelmän kehittamisestä UHPLC-QQQ-MS laitteistolle sekä ihmisenlihassolunäytteiden analysoinnista kehitetyn analyysimenetelmän avulla. Tämän tutkimuksen tulokset ja johtopäätökset keskittyvät kuitenkin tarkemmin menetelmän kehitykseen UHPLC-QQQ-MS laitteelle ja varsinaisten lihassolunäytteiden analysointiin. Menetelmän kehitys keskittyi

muokkaamaan jo olemassa olevaa menetelmää siten, että se olisi herkkyydeltään sellainen, että se kykenee analysoimaan konsentraatioiltaan hyvin pieniä näytteitä. Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia ihmisen lihassolunäytteistä fluksomiikkaa UHPLC-QQQ-MS-laitteistolla, joten menetelmän muokkaus analysoimiseen sopivaksi oli isossa roolissa. Fluksomiikkaa tutkittiin UHPLC-QQQ-MS-laitteella analysoimalla tiettyjä aminohappoja, joita lihassolut tuottivat, kun lihassolujen annettiin vaikuttaa ^{13}C -isotooppileimatun glukoosiliuoksen kanssa. Menetelmän kehityksessä keskeisessä roolissa olivat puskureiden konsentraation, aminohappojen isotopologien siirtymien ja laiteparametrien optimointi. Optimointi tehtiin esimerkiksi vertailemalla saatuja mittaustuloksia kahden eri puskurikonsentraation välillä, muuttamalla isotopologien siirtymiä sekä muuttamalla laiteparametrien osalta esimerkiksi muutamalla retentioaikoja ja niiden aikaikkunoiden suuruutta.

Menetelmän kehityksen sekä varsinaisten ihmisen lihassolunäytteiden lisäksi, tutkimuksen kokeellisessa osassa testattiin menetelmän toimivuutta myös UHPLC-QTOF-MS-laitteistolla sekä mitattiin varsinaisten ihmisen lihassolujen mediuunäytteitä. Kuitenkin kiireellisen aikataulun vuoksi, näistä saatuihin mittaustuloksiin ei ehditty pureutumaan sen tarkemmin. Lyhykäisyydessään voitiin kuitenkin todeta, että menetelmä toimi myös UHPLC-QTOF-MS-laitteistolla. Laitteistolta saatiin mittaustuloksia analysoitavaksi, mutta haasteilta ei kuitenkaan selvitty. Näyteajojen aikana havaittiin suurta paineiden nousua, jonka seurauksena mittausten aikana paineet saattoivat nousta yli turvarajojen, mikä keskeytti analysoinnin. Painevaihtelun korjaaminen ja paineen tasapainottaminen olisi vaatinut parempaa perehtymistä menetelmän sekä sen parametrien muokkaamiseen laitteistolle sopivaksi, jotta olisi voitu saavuttaa optimaaliset mittaolosuhteet. Ihmisen lihassolujen mediuunäytteiden osalta ehdittiin tekemään kokeellisen osan aikana itse näytteiden mittaukset, mutta aikarajan vuoksi mittaustuloksia ei ehditty käsittelemään kokonaisuudessaan, jonka vuoksi niiden tulokset rajattiin tulostarkastelun ulkopuolelle.

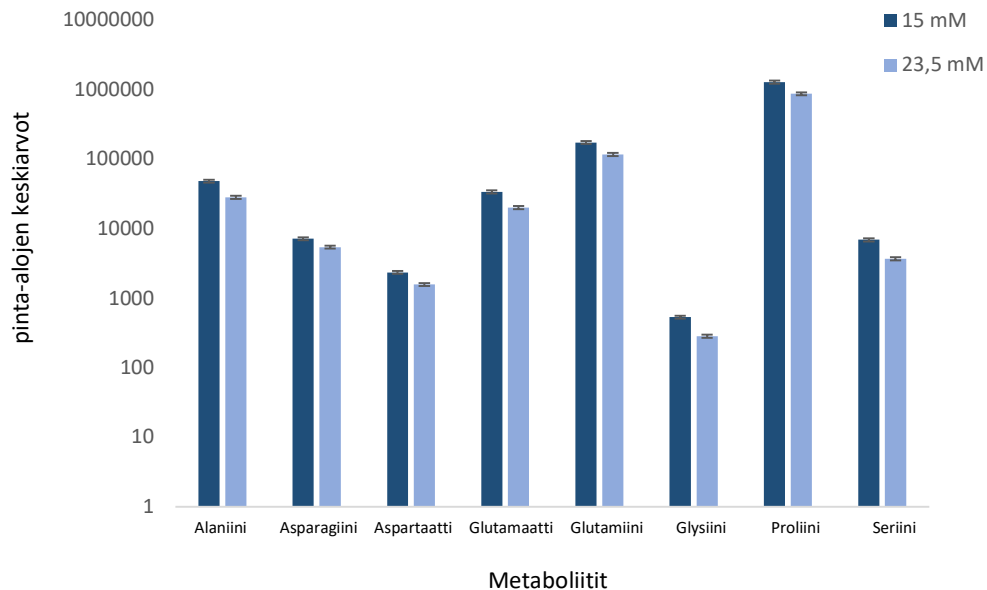
8.1. Puskuriliuosten konsentraation optimointi

Tutkimus aloitettiin puskuriliuosten konsentraation optimoinnilla laitteistolle ja menetelmälle sopivaksi. Ennen tutkimuksen aloittamista, menetelmään oli optimoitu puskuriliuokset A ja B. Kuitenkin hyvin alussa tutkimusta huomattiin, että nämä jo optimoidut puskuriliuokset olivat konsentraatioiltaan huomattavasti suunniteltua väkevämpiä. Kirjallisuuden perusteella puskuriliuosten konsentraation tuli olla 15 mM, mutta laskuvirheen vuoksi menetelmään optimoitujen puskuriliuosten konsentraatio oli 23,5 mM. Kun tämä laskuvirhe todettiin, päädyttiin menetelmää optimoimaan ja testaamaan kahdella eri puskurikonsentraatiolla eli tässä tapauksessa 15 mM ja 23,5 mM. Tämän testin tarkoituksena oli selvittää kumpi puskurikonsentraatio olisi tutkimuksen ja analysoinnin kannalta parempi vaihtoehto.

Testissä valmistettiin molemmat, 15 ja 23,5 mM, puskuriliuokset, joita hyödyntäen analysointiin sekä positiivisella, että negatiivisella polarisaatiolla metaboliitteja standardinäytteistä. Testimittauksissa käytettiin negatiivisella polarisaatiolla mitattaessa 1 μ M ja 10 μ M standardinäytteitä ja positiivisella polarisaatiolla mitattaessa 10 μ M ja 900 μ M standardinäytteitä. Standardinäytteistä tehtiin rinnakkaismittaukset siten, että negatiivisella polarisaatiolla 10 μ M standardi mitattiin neljä kertaa sekä 1 μ M kolme kertaa ja positiivisella polarisaatiolla 10 μ M mitattiin neljä kertaa ja 900 μ M kolme kertaa.

Kun mittaukset oli saatu tehtyä, verrattiin saatuja tuloksia toisiinsa ja analysoitiin, löytyikö puskuriliuoksien väkevyyksien välillä merkittäviä eroja. Tulosten perusteella voitiin todeta, että kirjallisuuden mukaiset 15 mM puskuriliuokset antoivat luotettavimpia tuloksia kuin 23,5 mM puskuriliuokset.⁴⁶ Havaittiin, että 15 mM puskuriliuokset tuottivat prosentuaalisesti 35 ± 7 % runsaampia tuloksia, 23,5 mM puskuriliuoksiin nähden, positiivisella polarisaatiolla mitattuna ja 13 ± 12 % negatiivisella polarisaatiolla mitattuna. Laskettujen muutos-% ja niiden keskiarvon perusteella voitiin siis todeta, että 15 mM puskuriliuokset tuottivat prosentuaalisesti runsaampia tuloksia verrattuna 23,5 mM puskuriliuoksiin (kuva 19). Prosenttiosuudet on saatu laskemalla ensin jokaiselle analysoitavalle metaboliitille rinnakkaismittausten pinta-alojen keskiarvo (kummallekin sekä 15 mM että 23,5 mM). Pinta-alojen keskiarvon laskemisen jälkeen laskettiin

muutoksen prosentuaalinen osuus jokaiselle metaboliitille, 15 mM ja 23,5 mM tulosten välillä, jonka jälkeen näistä laskettiin keskiarvo sekä keskihajonta.



Kuva 19. Havainnollistava kuva metaboliittien pinta-alojen keskiarvoista kahden eri väkevyisen puskuriliuoksen välillä.

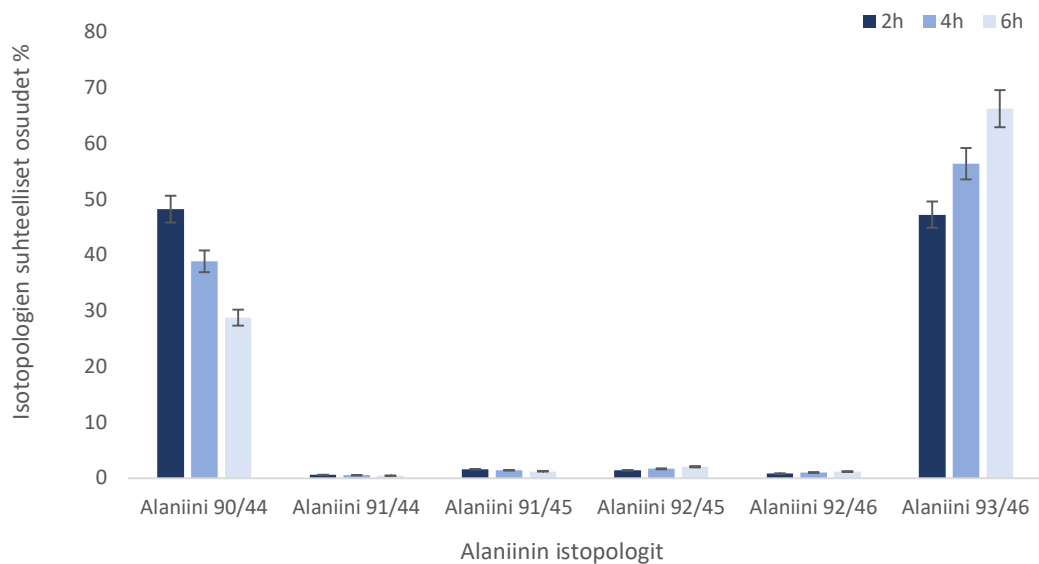
8.2. Menetelmän muokkaus UHPLC-QQQ-MS laitteistolle

Menetelmän kehitystä sekä muokkausta tehtiin useassa eri vaiheessa. Se koostui erilaisten näytteiden analysoinnista sekä itse menetelmän optimoinnista. Menetelmän kehityksen osalta analysointia tehtiin hiiren ja ihmisen lihassolunäytteillä. Niiden analysoinnista saatujen tulosten perusteella pyrittiin muokkaamaan analyttien isotopologiin siirtymiä sekä niiden retentioaikoja optimaaliseksi, jotta menetelmä soveltui kokeellisen osan loppupuolella varsinaisten ihmisen lihassolunäytteiden analysoimiseen. Näin ollen menetelmän kehitys ja muokkaus oli isossa roolissa kokeellisessa osassa, koska sen avulla pyrittiin optimoimaan menetelmä sellaiseksi, että se pystyy tuottamaan laadullisesti hyviä analyysituloksia.

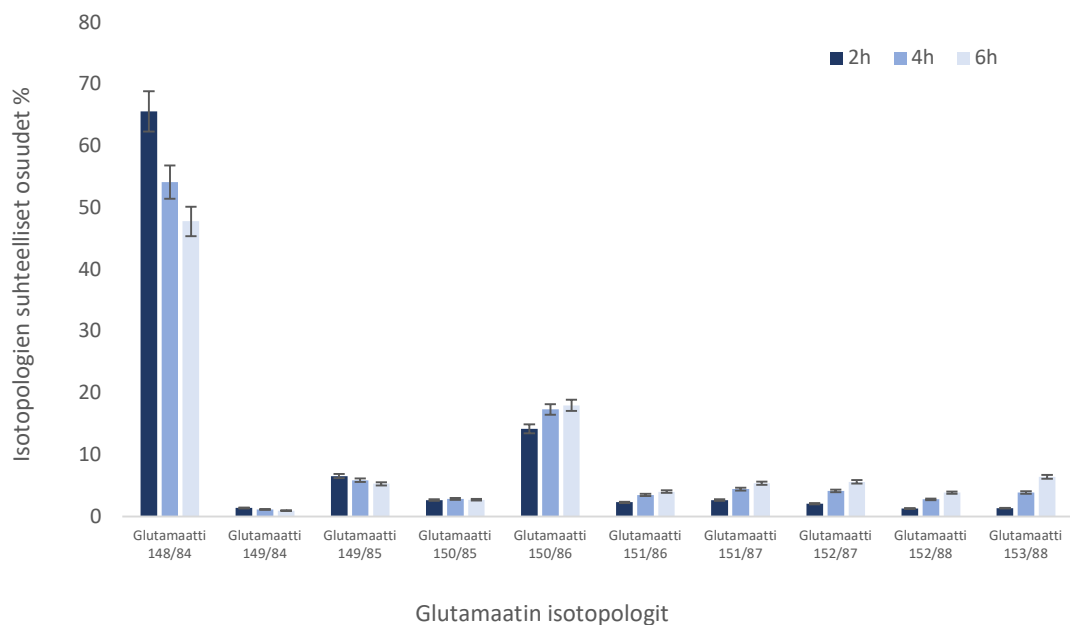
Menetelmän kehitys ja muokkauksen lisäksi kokeellisessa osassa kiinnitettiin huomioita näytteiden valmistukseen ja etenkin näytekeräykseen. Näytekeräyksessä isossa roolissa oli aikapisteet, joissa näytekeräys suoritettiin, sekä kuinka monta kuoppaa kuoppalevyiltä kerättiin kutakin näytettä kohden. Niin kutsutun kuoppatestin tarkoituksena oli selvittää, mikä on riittävä määrä kuoppia näytettä kohden, jotta voidaan saavuttaa massaspektrometrillä riittävä runsaus. Puolestaan aikapistevertailun tehtävänä oli havaita kuinka paljon metaboliitteja syntyy näytteessä, kun sen on annettu vaikuttaa ^{13}C -isotooppileimatun glukoosin kanssa eri aikapisteiden verran. Aikapistevertailu oli isossa roolissa koko kokeellisen osan ajan, mutta etenkin kokeellisen osan loppupuolella, kun mitattiin ihmisen lihassolunäytteet tutkimusta varten. Aikapistevertailun tarkoituksena oli havainnoida lihassolujen aineenvaihduntareittien virtausnopeutta, jota analysoitiin tutkimalla näytteistä UHPLC-QQQ-MS avulla tiettyjä metaboliitteja ja niiden isotooppipattereita eli isotopologeja.

8.2.1 Aikapistevertailu

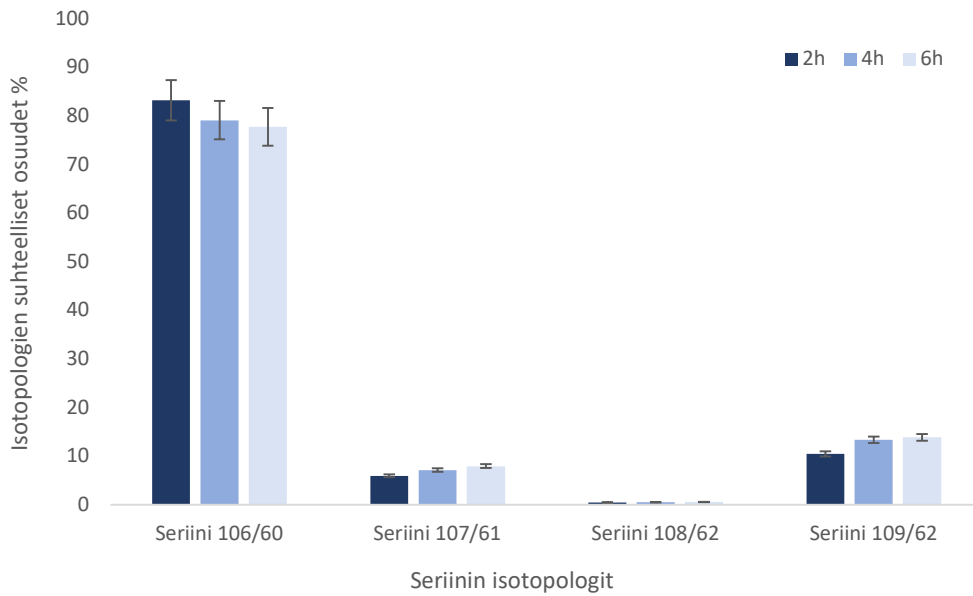
Aikapistevertailun tarkoituksena oli havainnoida metaboliittien leimaantumista tietyissä aikapisteissä. Aikapistevertailu suoritettiin hiiren lihassolunäytteillä siten, että lihassolujen annettiin vaikuttaa ^{13}C -isotooppileimatun glukoosiliuoksen kanssa joko 2, 4 tai 6 tuntia. Oletuksena oli, että mitä kauemmin lihassolujen annettiin vaikuttaa glukoosiliuoksen kanssa, sitä runsaammin metaboliittien hiilet leimaantuivat ^{13}C :ksi. Tätä ilmiötä on havainnollistettu kuvaajilla, joissa on esitetty alaniinin, glutamaatin, seriinin ja glysiinin isotopologien suhteelliset prosenttiosuudet 2, 4 ja 6 tunnin aikapisteissä (kuvat 20-23). Kuvaajissa on esitetty alaniinin M+0-3, glutamaatin M+0-5, seriinin M+0-3 ja glysiinin M+0-3 isotopologeja ja niiden muodostumista ajan funktiona. Jokaiselle isotopologille laskettiin suhteellinen prosenttiosuus kussakin aikapisteessä kaavan 2 avulla ja tulokset sijoitettiin kuvaajiin siten, että x-akselilla on esitetty aminohappojen eri isotopologit ja y-akselilla niiden suhteelliset prosenttiosuudet kussakin aikapisteessä.



Kuva 20. Alaniinin isotopologien suhteelliset prosenttiosuudet 2, 4 ja 6 tunnin aikapisteissä.
 M+0=90/44, M+1=90/44 ja 91/45, M+2=92/45 ja 92/46, M+3=93/46.

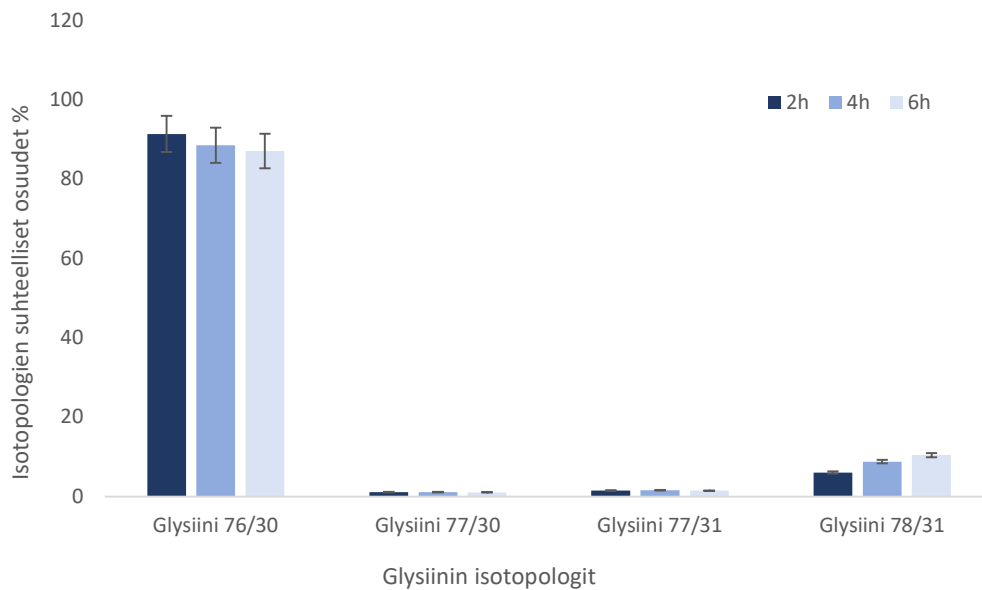


Kuva 21. Glutamaatin isotopologien suhteelliset prosenttiosuudet 2, 4 ja 6 tunninaikapisteissä.
 M+0=148/84, M+1=149/84 ja 149/85, M+2=150/85 ja 150/86, M+3=151/86 ja 151/87,
 M+4=152/87 ja 152/88, M+5=153/88.



Kuva 22. Seriiinin isotopologien suhteelliset prosenttiosuudet 2, 4 ja 6 tunnin aikapisteissä.

M+0=106/60, M+1=107/61, M+2=108/62, M+3=109/62.



Kuva 23. Glysiinin isotopologien suhteelliset prosenttiosuudet 2, 4 ja 6 tunnin aikapisteissä.

M+0=76/30, M+1=77/30, M+2=77/31, M+3=78/31.

$$\text{suhteellinen} - \% = \frac{\text{isotopologin pinta} - \text{ala}}{\text{isotopologien pinta} - \text{alojen summa}} \times 100 \quad (2)$$

Alla esimerkki lasku seriinin M+3 isotopologin suhteellisen prosenttiosuudesta laskemisesta aikapisteessä 2 tuntia.

$$\text{suhteellinen} - \% = \frac{9537,44}{9537,44 + 75761,29 + 5402,31 + 393,81} \times 100 \approx 10,47$$

Tarkasteltaessa esimerkiksi alaniinin isotopologien suhteellisia prosenttiosuuksia voidaan todeta, että eniten koko tarkasteluajavälillä havaittiin isotopologeja M+0 (alaniini 90/44) ja M+3 (alaniini 93/46). Huomattavaa on myös se, että M+3 isotopologin suhteellinen prosenttiosuus kasvoi M+0 nähden, mitä kauemmin lihassolujen annettiin vaikuttaa ¹³C-isotooppileimatun glukoosin kanssa. Havainnon perusteella voidaan todeta, että 6 tunnissa lihassolujen muodostamasta alaniinista, prosentuaalisesti suurempi osuus on isotopologiltaan M+3 (tämä tarkoittaa sitä, että alaniinin rakenteesta (C₃H₇NO₂) kaikki kolme hiiltä ovat leimaantuneet ¹³C-isotoopilla). Verratessa 6 tunnin aikapistettä 2 tunnin aikapisteeseen voidaan huomata, kuinka iso vaikutus vaikutusajalla ¹³C-isotooppileimatun glukoosin kanssa on isotopologien muodostumiseen. Kuten kuvasta 20 voidaan huomata, kahden tunnin vaikutusajan jälkeen M+0 ja M+3 isotopologeja havaittiin prosentuaalisesti toisiinsa nähden yhtä paljon. Tutkimuksen aikana lisäksi todettiin, että leimaantuminen jatkuu vielä 6 tunnin jälkeen. Leimaantumisen jatkumista, ajan funktiona, tarkastellaan tarkemmin kappaleessa 8.3.2.

Verrattuna muihin metaboliitteihin, kuten esimerkiksi seriiniin, alaniinin hiilet leimaantuivat huomattavasti tehokkaammin 6 tunnin aikapistetarkastelun aikana. Tämä voidaan havaita tarkastelemalla kuvaa 23, jossa seriiniin isotopologia M+0 havaittiin huomattavasti enemmän, koko 6 tunnin ajanjakson aikana, verrattuna sen muihin isotopologeihin. Lisäksi tuloksista

ilmeni, että aikapisteiden välillä seriinin isotopologien suhteellinen prosenttiosuus ei muuttunut merkittävästi, verrattuna esimerkiksi alaniinin muutoksiin. Tämä sama ilmiö havaittiin seriinin lisäksi myös glysiinin ja glutamaatin osalta, joissa M+0 isotopologia esiintyi huomattavasti enemmän verrattuna metaboliitin muihin isotopologeihin.

Yhteenvedonä näistä edellä mainituista havainnoista voidaan todeta, että vaikutusajalla lihassolujen ja ^{13}C -isotooppileimatun glukoosin kanssa, voi olla suurikin merkitys muodostuviin isotopologeihin erilaisten metaboliittien osalta. Nämä havainnot ovat myös kytköksissä aineenvaihduntareittien virtausnopeuksiin eli fluksiin, koska osa aineenvaihduntareiteistä voivat toimia tehokkaammin mitä toiset. Tämä ilmiö voidaan havaita esimerkiksi vertaamalla alaniinin isotopologien muodostumista seriinin isotopologien muodostumiseen.

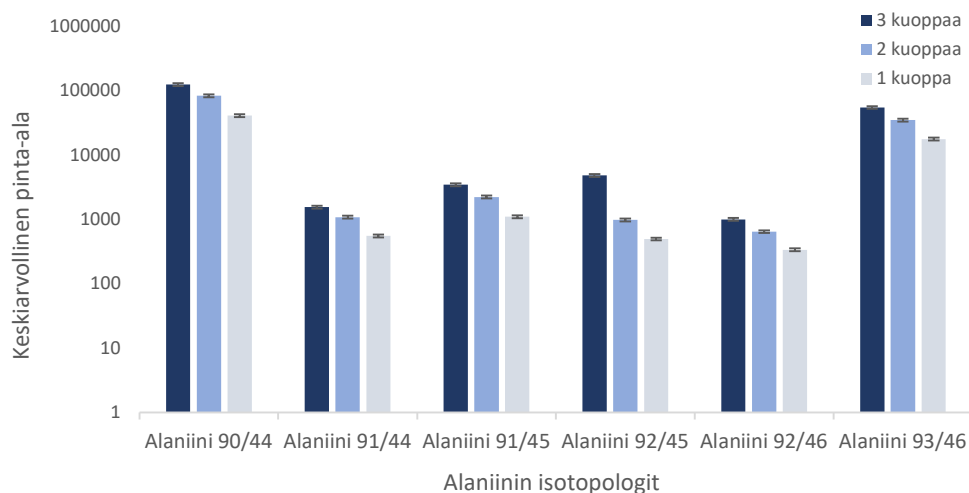
8.2.2 Kuoppatesti

Kuoppatestin tarkoituksena oli määrittää, kuinka monta kuoppaa kerättäisiin yhtä näytettä kohden kuoppalevyiltä, joihin lihassoluja oli erilaistettu ja annettu vaikuttaa ^{13}C -isotooppileimatun glukoosin kanssa. Tutkimuksessa keskityttiin tarkastelemaan kuoppien määrän vaikutusta tuloksiin, kun kuoppia kerättiin yhteen näytteeseen joko 1, 2 tai 3 kuoppaa. Kuoppatesti suoritettiin soluviljelemällä ja keräämällä ihmisen lihassolunäytteitä. Tutkimuksen aikana tehtiin kuoppatestejä myös hiiren lihassolunäytteille, mutta koska menetelmää haluttiin muokata juuri ihmisen lihassolujen analysointiin, otettiin tulosten tarkastelussa ainoastaan huomioon ihmisen lihassolunäytteille tehdyt kuoppatestit. Tämä siksi, koska hiiren lihassolut tuottavat prosentuaalisesti tehokkaammin metaboliitteja mitä ihmisen lihassolut, joten vaikka yksi kuoppa/näyte olisi riittänyt hiiren lihassoluille antamaan luotettavia mittaustuloksia, ei näin olisi välttämättä tapahtunut ihmisen lihassolujen osalta.

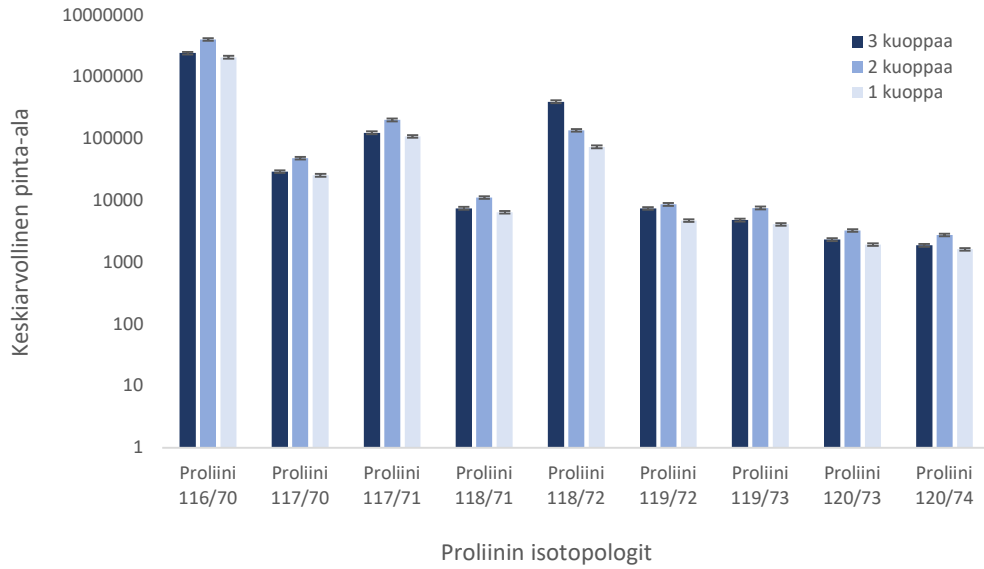
Tarkastellessa kuoppatestin tuloksia ihmisen lihassolunäytteistä voitiin huomata, että pinta-alojen keskiarvot laskivat suhteessa kuoppien määrään nähden. Tarkastelun kohteena olivat metaboliitit alaniini, asparagiini, aspartaatti, glutamiini, glutamaatti, glysiini, proliini sekä

seriini ja niiden isotopologiin keskiarvot pinta-ala. Kuvissa 24-26 on esitetty havainnollistavat kuvaajat alaniinin, proliinin ja glutamaatin osalta ja kuinka kuoppien määrä vaikutti metaboliittien havaittuun runsauteen näytteessä (kuvaajissa on merkitty diagrammien yhteyteen kunkin metaboliitin lähtö- ja tuoteionit, jotka oli ennalta määritetty menetelmään mittauksia varten). Kuten kuvaajista voidaan havaita, jokaisella kuoppamäärällä voidaan saada luotettavia ja riittävän runsaita tuloksia. Huomattavaa kuitenkin saaduissa tuloksissa on se, että proliinin osalta voidaan havaita, että 2 kuoppaa/näyte tuottaa keskiarvot pinta-alaltaan runsaampia tuloksia verrattuna muihin kuoppamääriin. Tämä ero on havaittavissa jokaisessa proliinin isotopologiissa, poikkeuksena proliini 118/72.

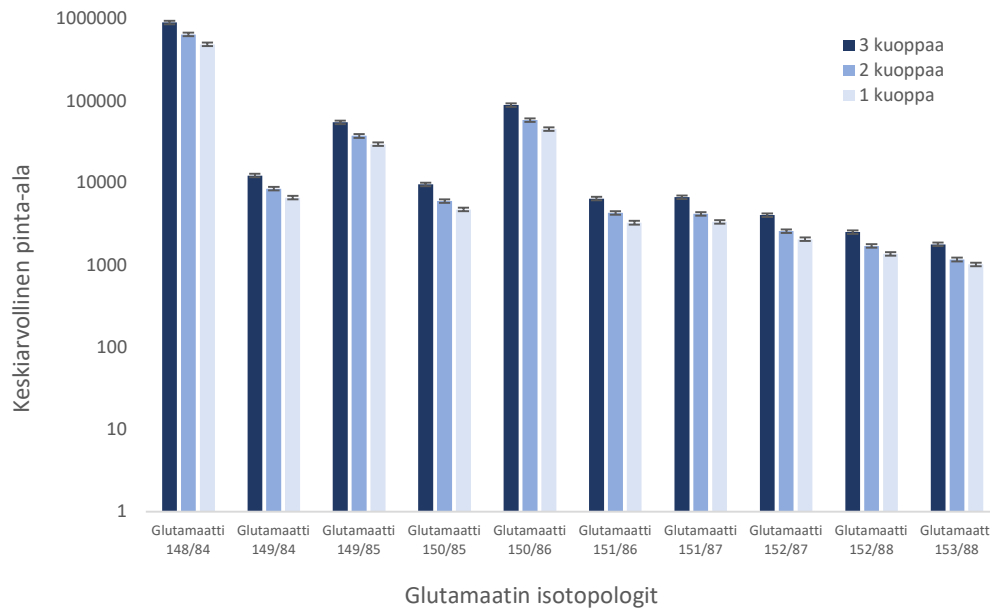
Kuoppatestin tuloksia analysoidessa voitiin todeta, että tutkimuksen kannalta sopivin kuoppa määrä/näyte on kaksi kuoppaa. Tähän tulokseen päädyttiin saatujen mittaustulosten perusteella ja sen lisäksi haluttiin minimoida mahdollisuutta, että metaboliitteja ei havaittaisi tarpeeksi, jos kuoppia olisi kerätty yksi kappale/näyte. Näiden edellä mainittujen lisäksi haluttiin pyrkiä minimoimaan ylimääräinen työ soluviljelyn ja näytekerauksen osalta, koska mitä vähemmän kuoppia on kerättävänä näytettä kohden, sitä vähemmän tarvitsee soluja viljellä ja erilaistaa kuoppalevyille. Tehtyjen kuvaajien perusteella voitiin myös todeta, että joidenkin metaboliittien osalta kaksi kuoppaa näytettä kohden tuottaa keskiarvot pinta-alaltaan runsaampia tuloksia.



Kuva 24. Kerättyjen kuoppien vaikutus alaniinin isotopologiin runsauteen. M+0=90/44, M+1=91/44 ja 91/45, M+2=92/45 ja 92/46, M+3=93/46.



Kuva 25. Kerättyjen kuoppien vaikutus proliinin isotopologien runsauteen. M+0=116/70, M+1=117/70 ja 117/71, M+2=118/71 ja 118/72, M+3=119/72 ja 119/73, M+4=120/73 ja 120/74.



Kuva 26. Kerättyjen kuoppien vaikutus glutamaatin isotopologien runsauteen. M+0=148/84, M+1=149/84 ja 149/85, M+2=150/85 ja 150/86, M+3=151/86 ja 151/87, M+4=152/87 ja 152/88, M+5=153/88.

8.3. Ihmisen lihassolunäytteiden analysointi

Varsinaisten ihmisen lihassolunäytteiden analysointi keskittyi tarkastelemaan aikapisteiden ja kahden eri seerumin vaikutusta saatuihin mittaustuloksiin. Aikapistevertailu toimi samalla tavalla kuin hiiren lihassolunäytteillä tutkittaessa, joissa verrattiin vaikutusajan merkitystä isotopologien muodostumiseen näytteissä. Kahden eri seerumin vaikutuksen analysoinnin tarkoituksena oli puolestaan selvittää, kuinka näiden seerumien eri määrä kahdessa eri ¹³C-isotooppileimatassa glukoosiliuoksessa stimuloisi metaboliittien leimaantumista. Näiden edellä mainittujen lisäksi ihmisen lihassolunäytteistä analysoitiin kiinnostuksen kohteena olevien aminohappojen alaniinin, asparagiinin, aspartaatin, glutamiinin, glutamaatin, glysiinin, proliinin sekä seriinin tiettyjä isotopologeja ja niiden runsautta eri aikapisteissä. Isotopologien tutkimisessa haluttiin erityisesti keskittyä kuinka leimattujen ja leimaamattomien metaboliittien runsaus poikkeaa prosentuaalisesti toisiinsa nähden tietyissä aikapisteissä.

Ihmisen lihassolunäytteitä valmistettiin tutkimuksia ja analysointia varten 24 kappaletta, joista puolissa käytettiin ¹³C-isotooppileimatua glukoosiliuosta, jossa vähemmän HS-seerumia ja puolissa ¹³C-isotooppileimatua glukoosiliuosta, jossa enemmän FBS-seerumia. Näytteiden annettiin vaikuttaa näiden kahden eri ¹³C-isotooppileimatun glukoosin kanssa 1, 3, 6 tai 24 tuntia. Näiden aikapisteiden lisäksi 4,5 tunnin aikapisteessä kerättiin näytteet, jotka toimivat tässä tutkimuksessa testinäytteinä ja niiden avulla menetelmää vielä muokattiin kokeellisen osan loppupuolella, ennen viimeisiä varsinaisten ihmisen lihassolunäytteiden mittaamista.

Lihassolunäytteet mitattiin satunaisessa järjestyksessä positiivisella sekä negatiivisella polarisaatiolla UHPLC-QQQ-MS-laitteistolla. Kuitenkin laitteiston kanssa ilmenneiden ongelmien vuoksi, lihassolunäytteille saatiin ainoastaan analysoitua mittaustulokset positiivisella polarisaatiolla. Positiivisella polarisaatiolla mittaaminen oli tutkimuksen osalta keskeisimmässä roolissa, koska aminohapot havaittiin juuri kyseisen polarisaation avulla. Negatiivinen polarisaatio antoi puolestaan dataa muista aineenvaihduntatuotteista, jotka eivät olleet tämän tutkimuksen kannalta keskeisessä roolissa.

8.3.1 Testinäytteet ja menetelmän optimointi

Kuten jo aikaisemmin todettiin, testinäytteinä käytettiin ihmisen lihassolunäytteitä, joiden oli annettu vaikuttaa ^{13}C -isotooppileimatus glukoosiliuoksen kanssa 4,5 tuntia. Testinäytteet oli valmistettu siten, että yhteen näytteeseen oli kerätty kolme kuoppaa näytettä kohden. Testinäytteitä valmistettiin 2 kappaletta, joista toiseen käytettiin korkeapitoista seerumia ja toiseen matalapitoista. Testinäytteiden avulla pyrittiin optimoimaan menetelmää analysoitavien metaboliittien lähtö- ja tuoteioneita. Ennen testinäytteiden mittausta menetelmän lähtö- ja tuoteionien m/z -arvoja muutettiin aikaisempien mittaustulosten perusteella, kun huomattiin, että osa aminohappojen siirtymistä antoi virheellisiä tuloksia tai ei tuloksia ollenkaan. Näiden jälkeen testinäytteet mitattiin UHPLC-QQQ-MS-laitteella ja saatuja mittaustuloksia analysoitiin sekä niiden perusteella tehtiin muutokset menetelmään siirtymien osalta. Testinäytteiden mittauksissa analysoitiin alaniinin, asparagiinin, aspartaatin, glutamiinin, glutamaatin, glysiinin, proliinin sekä seriinin isotopologeja ja analyysitulosten perusteella tehtiin muutoksia isotopologien lähtö- ja tuoteioneihin.

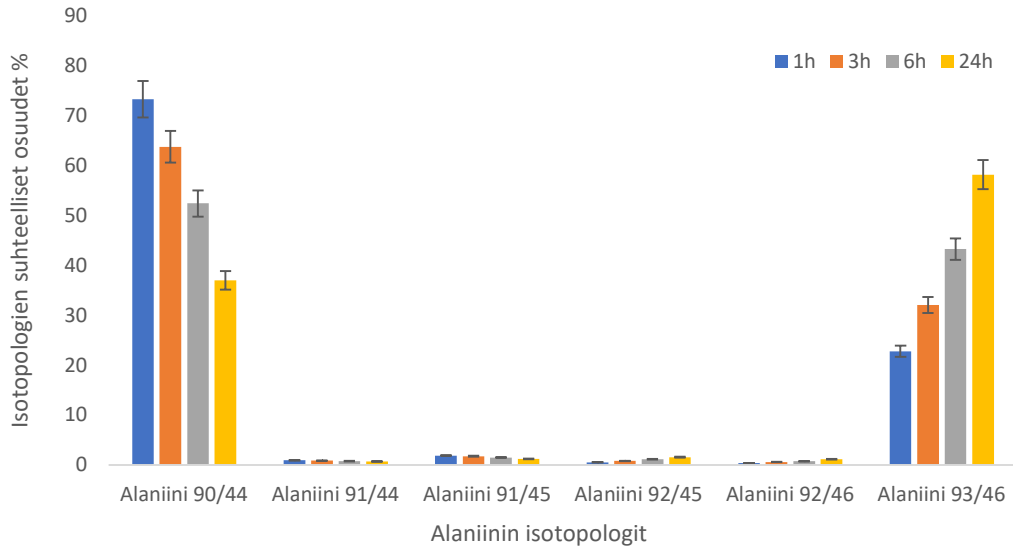
Testinäytteiden avulla muutettiin seriinin, glutamiinin ja aspartaatin siirtymiä menetelmään, koska näiden aminohappojen osalta huomattiin, että aikaisemmat mittaustulokset eivät tuottaneet tarpeeksi luotettavia tuloksia. Siirtymien muokkaamisen tarkoituksena oli parantaa eri isotopologien havaitsemista, jotta halutut lähtö- ja tuoteionit voitiin havaita kullekin isotopologille niille asetetuissa aikaikkunoissa. Näiden muokkausten avulla pyrittiin optimoimaan menetelmä sellaiseksi, että sen avulla voitiin luotettavasti ja tarkasti analysoida metaboliittien isotopologeja. Menetelmää haluttiin muokata lähtö- ja tuoteionien osalta siksi, että aikaisemmissa mittauksissa, joita tutkimuksen aikana tehtiin hiiren ja ihmisen lihassoluilla, huomattiin tiettyjen metaboliittien isotopologien antavan virheellisiä tuloksia tai ei tulosta ollenkaan. Saatujen mittaustulosten perusteella todettiin, että seriinin, glutamiinin ja aspartaatin osalta menetelmään muokatut siirtymät ovat fluksomiikan tutkimuksen kannalta paremmat, jotta voidaan saada luotettavia mittaustuloksia (lopulliset mittauksissa käytetyt siirtymät esitetty taulukossa 7).

8.3.2 Aikapistevertailu

Aikapistevertailun tehtävänä oli selvittää ajan vaikutusta aminohappojen muodostumiseen aineenvaihduntareittejä pitkin. Kuten jo aikaisemmin todettiin, näytteet valmistettiin siten, että niiden annettiin vaikuttaa ^{13}C -isotooppileimatun glukoosin kanssa 1, 3, 6 tai 24 tuntia. Näytteitä valmistettiin yhteensä 24 kappaletta, joista puolet annettiin vaikuttaa korkeampi pitoisen seerumin kanssa ja puolet matalampi pitoisen seerumin kanssa. Seerumien vaikutuksiin saatuihin mittaustuloksiin perehdytään tarkemmin luvussa 8.3.3. Aikapistevertailu tehtiin kaikille analysoitaville aminohapoille, jotka olivat alaniini, asparagiini, aspartaatti, glutamiini, glutamaatti, glysiini, proliini sekä seriini. Jokaista aikapistettä kohden kerättiin näytteitä 6 kappaletta ja jokaisesta näytteestä, kullekin aikapisteelle, analysoitiin edellä mainitut metaboliitit ja niiden eri isotopologit.

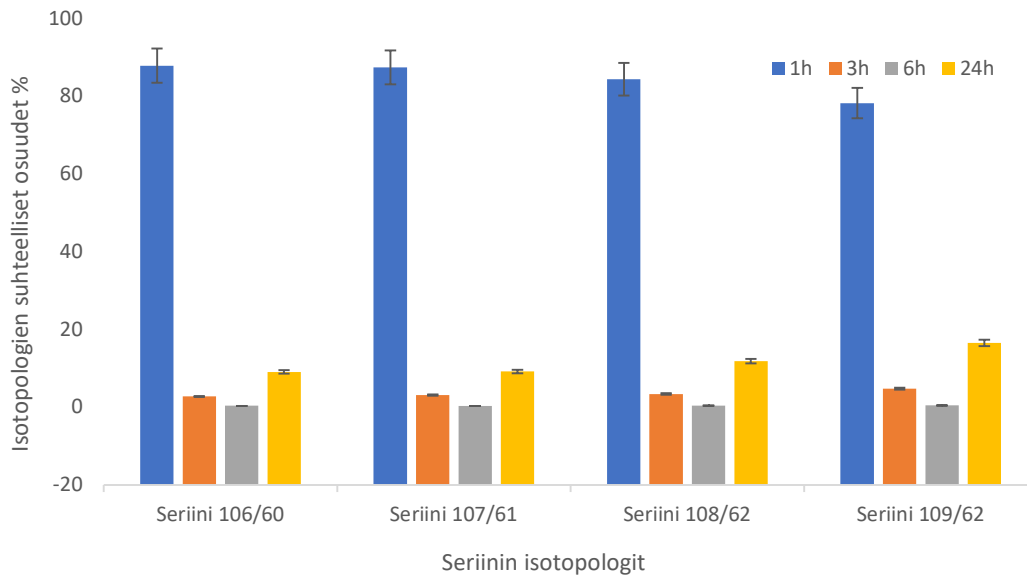
Oletuksena oli, että mittaustulosten avulla voitaisiin havainnoida ihmisen lihassolujen aineenvaihduntareittien fluksomiikkaa ja sitä, kuinka nopeasti ne tuottavat kiinnostuksen kohteena olevia aminohappoja sekä niiden eri isotopologeja. Oletuksena oli, että mitä kauemmin lihassolujen annettiin vaikuttaa ^{13}C -isotooppileimatun glukoosin kanssa, sitä enemmän havaittaisiin isotopologeja, joissa useampi hiili aminohapoista olisi leimaantunut ^{13}C -isotoopilla. Kuvaajien avulla voitiin havainnollistaa alaniinin ja seriinin isotopologien suhteelliset prosenttiosuudet toisiinsa nähden (kuva 27 ja 28). Kuten kuvaajista voidaan huomata, on aminohappojen isotopologien muodostumisessa huomattavia eroja, kun niiden muodostumista verrataan aikapisteiden suhteen. Merkittävin ero esimerkiksi on havaittavissa alaniinin ja seriinin osalta. Alaniinin hiilet leimaantuvat sitä voimakkaammin, mitä kauemmin solujen on annettu vaikuttaa ^{13}C -glukoosiliuoksen kanssa. Seriinin kuvaajasta voidaan puolestaan havaita, että 1 tunnin kohdalla voidaan prosentuaalisesti havaita seriinin kaikkia isotopologeja hyvin runsaasti muihin aikapisteisiin verrattuna. Alaniinin leimautumiseen verrattuna, seriinin isotopologeja voidaan havaita runsaasti hyvin varhaisessa vaiheessa, mutta mitä pidemmälle aikapisteissä mennään sitä vähemmän prosentuaalisesti aineenvaihduntareitit tuottavat seriiniä. Tämän havainnon perusteella voidaan todeta, että seriinin isotopologien muodostuminen on hyvin voimakasta alussa, mutta sen tuotanto hidastuu mitä kauemmin lihassolujen on annettu vaikuttaa isotooppileimatun glukoosin kanssa. Puolestaan alaniinin M+0 isotopologia havaitaan 1 tunnin kohdalla runsaasti, mutta systemaattisesti sen prosenttiosuus laskee mitä kauemmin lihassolut vaikuttavat isotooppileimatun glukoosin

kanssa. Merkittävää on kuitenkin se, että alaniinin M+0 isotopologin prosentuaalisen osuuden laskiessa, ajan suhteen, kasvaa siinä samassa suhteessa M+3 isotopologin prosenttiosuus.



Kuva 27. Alaniinin isotopologien suhteelliset prosenttiosuudet 1, 3, 6 ja 24 tunnin aikapisteissä.

M+0=90/44, M+1=91/44 ja 91/45, M+2=92/45 ja 92/46, M+3=93/46

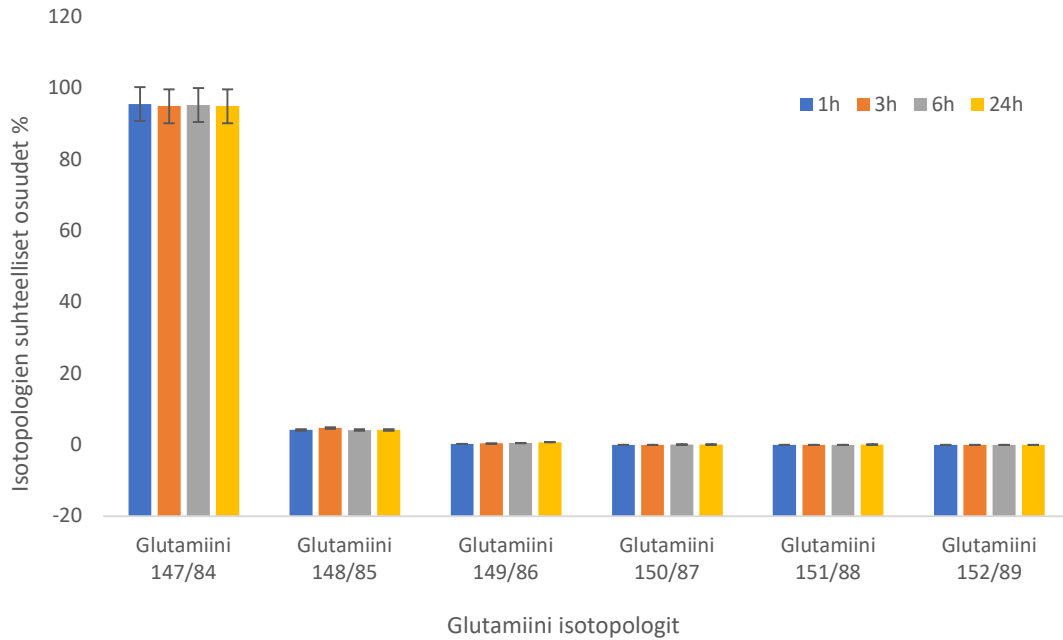


Kuva 28. Seriin isotopologien suhteelliset prosenttiosuudet 1, 3, 6 ja 24 tunnin aikapisteissä.

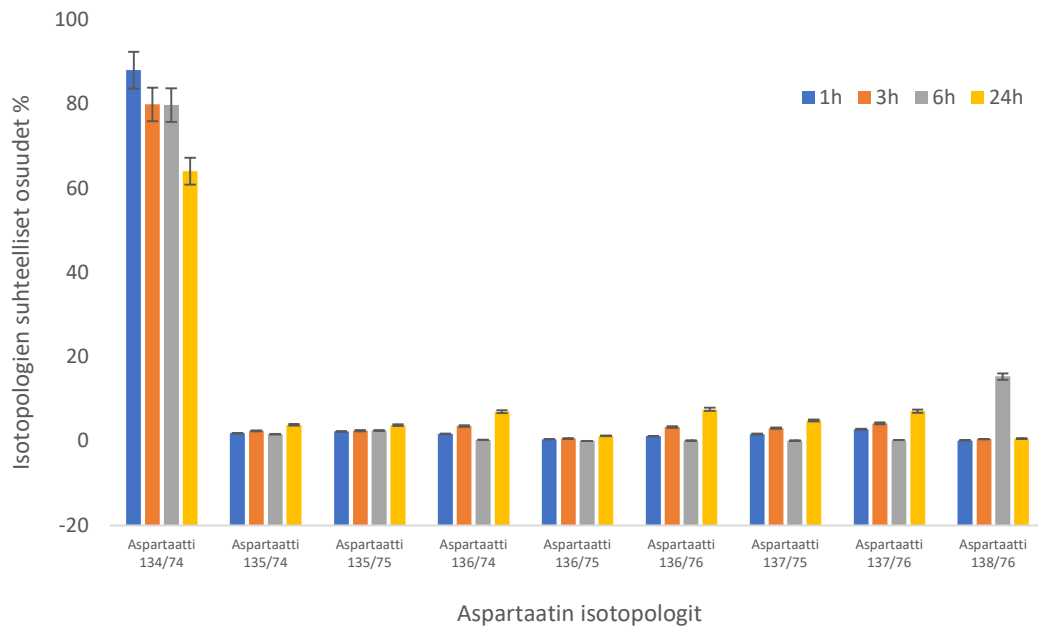
M+0=106/60, M+1=107/61, M+2=108/62, M+3=109/62.

Näistä edellä mainituista havainnoista voidaan todeta, alaniinin ja seriinin välillä, että niiden aineenvaihduntareitit toimivat eri virtausnopeuksilla toisiinsa nähden. Aineenvaihduntareitti, joka muodostaa seriiniä toimii aluksi hyvin vilkkaasti, mutta se kuitenkin hidastuu vaikutusajan kasvaessa ^{13}C -isotooppileimatun glukoosin kanssa. Puolestaan alaniinin aineenvaihduntareitin virtausnopeus pysyy ajansuhteen tasaisena. Tämä voidaan havaita kuvaajassa 21 siinä, että alaniinin hiilet leimaantuvat sitä voimakkaammin, mitä kauemmin lihassolujen on annettu vaikuttaa leimatun glukoosin kanssa.

Näitä samoja edellä mainittuja ilmiöitä voidaan havaita myös kuvaajissa 29 ja 30, joissa on kuvattu glutamiinin ja aspartaatin isotopologien suhteelliset prosenttiosuudet ajan suhteen. Kuitenkin merkittävänä erona voidaan nähdä, että glutamiini ja aspartaatti tuottavat prosentuaalisesti eniten M+0 isotopologia, kun muita isotopologeja havaitaan alle 5 %. Kuvaajista voidaan lisäksi huomata, että glutamiini tuottaa M+0 isotopologia saman verran suhteessa aikaan eli toisin sanoen merkittävää eroa M+0 isotopologin muodostumisessa ajan suhteen ei ole. Tämä voi olla merkki siitä, että lihassolut käyttävät glutamiinia sitä mukaa, kun sitä tuotetaan. Tätä havaintoa tukevat myös se, että ajan suhteessa glutamiinin muita isotopologeja ei huomata yhtä runsaasti mitä M+0. Tämä sama ilmiö voidaan myös nähdä aspartaatin kuvaajassa, jossa M+0 isotopologia muodostuu suhteessa muihin huomattavasti enemmän. Kuitenkaan isotopologien muodostuminen ei ole yksiselitteisesti kytköksissä glutamiinin ja aspartaatin kulutukseen suhteessa niiden tuotantoon, vaan isotopologien vähäisyys M+0 nähden voi selittyä myös aineenvaihduntareitin virtausnopeuden perusteella. Niin kuin jo aikaisemmassa kappaleessa todettiin, aminohappojen aineenvaihduntareittien virtausnopeudella eli fluksilla on iso merkitys muodostuvien isotopologien runsauteen ajan suhteen.



Kuva 29. Glutamiinin isotopologien suhteelliset prosenttiosuudet 1, 3, 6 ja 24 tunnin aikapisteissä. M+0=147/84, M+1=148/85 ja 149/86, M+2=150/87, M+3=151/88, M+4=152/89.



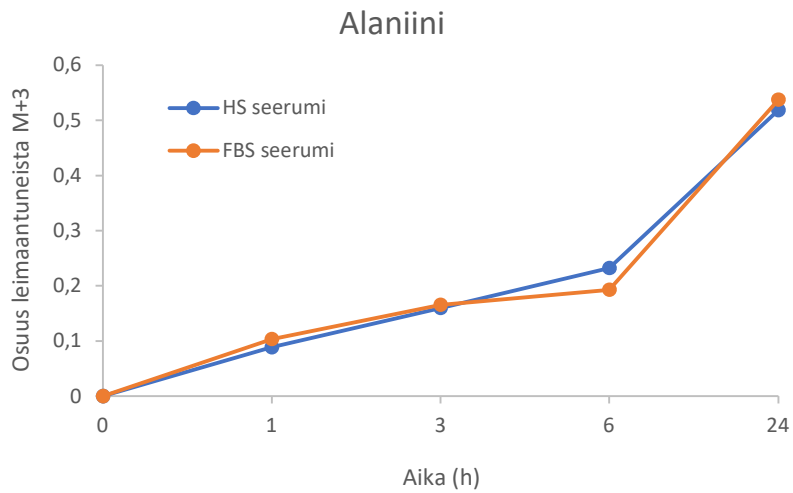
Kuva 30. Aspartaatin isotopologien suhteelliset prosenttiosuudet 1, 3, 6 ja 24 tunnin aikapisteissä. M+0=134/74, M+1=135/74 ja 135/75, M+2=136/74, 136/75 ja 136/76, M+3=137/75 ja 137/76, M+4=138/76.

8.3.3 Seerumin vaikutus mittaustuloksiin

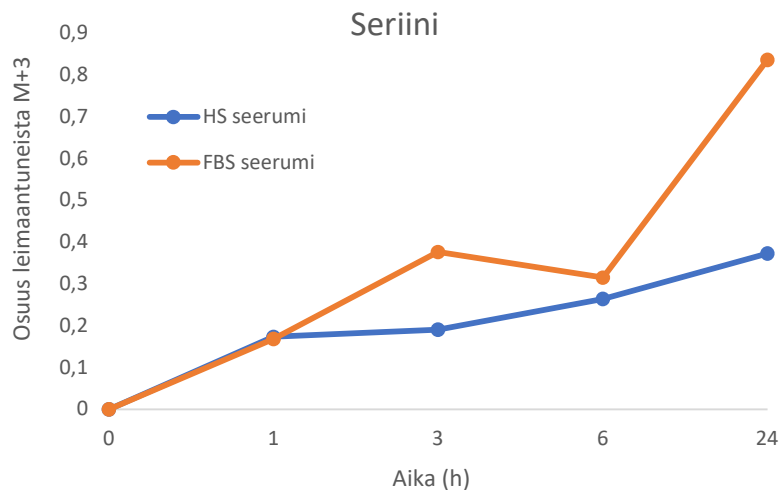
Tutkimuksen tarkoituksena oli aikapistevertailun lisäksi selvittää, kuinka paljon kaksi eri seerumia (HS- ja FBS-seerumi) ja niiden eri määrä ^{13}C -isotooppileimatussa glukoosiliuoksessa vaikutti saatuihin mittaustuloksiin. Oletuksena oli, että seerumit stimuloisivat aminohappojen ja niiden isotopologien muodostumista eri tavalla. Tutkimuksessa valmistettiin kaksi eri ^{13}C -isotooppileimattua glukoosiliuosta eli mediumliuosta, joihin lisättiin eri määrä HS- ja FBS-seerumia (taulukko 9). Näiden kahden ^{13}C -isotooppileimatun glukoosiliuoksen annettiin vaikuttaa lihassolujen kanssa aikaisemmin mainittujen aikapisteiden mukaisesti. Seerumeja lisättiin glukoosiliuoksiin eri määrä, jotta glukoosiliuosten pitoisuudet eroaisivat huomattavasti toisistaan prosentuaalisesti (toinen glukoosiliuoksista oli 2 % ja toinen 20 %). Isotooppileimattujen glukoosiliuosten haluttiin eroavan toisistaan, seerumien osalta, jotta mittaustuloksista pystyttiin havaitsemaan, onko seerumin pitoisuudella merkittävästi vaikutusta aminohappojen muodostumisessa. Seerumien vaikutustaalaniiniin ja seerinin M+3 isotopologin osuuteen kussakin aikapisteessä havainnollistettiin kuvaajien avulla (kuvat 31 ja 32).

Taulukko 9. Kahden eri ^{13}C -isotooppileimatun glukoosiliuosten valmistukseen tarvittavat liuokset ja niiden mitattavat määrät halutun konsentraation saavuttamiseksi

2 % HS-medium	20 % FBS-medium
54 ml DMEM (ilman glukoosia, pyruvaattia ja L-glutamiinia)	54 ml DMEM (ilman glukoosia, pyruvaattia ja L-glutamiinia)
540 µl P/S	540 µl P/S
440 µl pyruvaatti	540 µl pyruvaatti
338 µl L-glutamiini	540 µl L-glutamiini
1,230 ml ^{13}C -glukoosi	1,230 ml ^{13}C -glukoosi
1,08 ml HS	10,8 ml FBS
10,02 ml DMEM (1 g/ml glukoosia, 4 mM L-glutamiinia ja 1 mM pyruvaattia)	



Kuva 31. HS- ja FBS-mediumin vaikutus alaniini M+3 isotopologin muodostumiseen ajansuhteen.



Kuva 32. HS- ja FBS-mediumin vaikutus seriiniin M+3 isotopologin muodostumiseen ajansuhteen.

M+3 isotopologin osuus kussakin aikapisteessä on laskettu kaavan 2 mukaan. Kaavassa isotopologin osuus aikapisteissä 1, 3, 6 ja 24 tuntia on laskettu niin, että M+3 isotopologin pinta-ala jaettiin kaikkien havaittujen leimaantuneiden M+3 molekyylien yhteenlasketulla määrällä. M+3 isotopologin osuus laskettiin jokaiselle aikapisteelle kummankin vaikuttavan mediumin osalta ja sovitettiin saadut tulokset kuvaajaan ajan funktiona.

$$\text{osuus } (M + 3) = \frac{M + 3 \text{ pinta - ala}}{M + 3 \text{ kokonaismäärä } (1 - 24 h)} \quad 3$$

Alla esimerkki lasku, kuinka M+3 isotopologin osuus M+3 kokonaismäärästä on laskettu kussakin aikapisteessä. Esimerkissä laskettu alaniinin M+3 isotopologin osuus aikapisteessä 1 tunti, kun vaikuttavana mediumina käytetty matalapitoista HS-mediumia.

$$\text{osuus } (M + 3) = \frac{27895,96}{27895,96 + 50083,21 + 72789,32 + 162531,90} \approx 0,09$$

Kuten alaniinin kuvaajasta voidaan todeta HS- ja FBS-mediumilla ei ole merkittävää vaikutusta toisiinsa nähden alaniinin M+3 isotopologin muodostumisessa. Puolestaan kuvaajasta voidaan nähdä merkittävä ero seriinin M+3 isotopologin muodostumisessa etenkin aikapisteessä 24 tuntia. 24 tunnin jälkeen FBS-mediumin vaikutus M+3 muodostumiseen on merkittävä verrattuna HS-mediumiin. Tämä havainto voi kertoa siitä, että eri pitoisten seerumien vaikutus isotopologin muodostumiseen voidaan havaita vasta pidemmän vaikutusajan jälkeen.

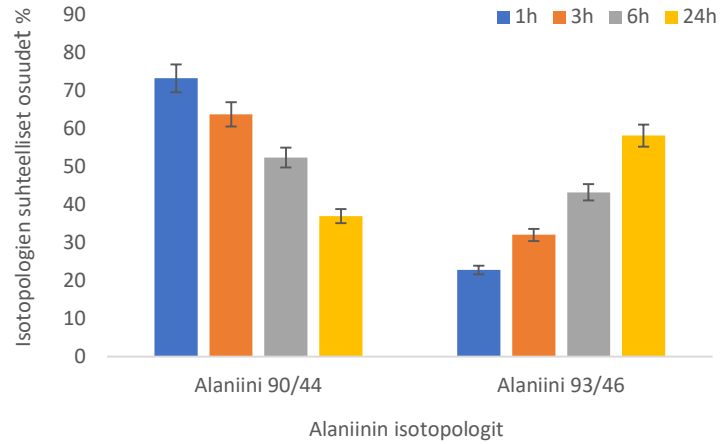
8.3.4 Aminohappojen isotopologiiden runsaus

Edellä mainittujen aikapistevertailun sekä seerumien vaikutuksen lisäksi, tutkimuksessa tarkasteltiin aminohappojen tiettyjen isotopologiiden runsautta verrattuna leimaamattomaan M+0 molekyyliin. Tarkastelun alla olivat taulukossa 10 esitetyt aminohappojen isotopologit, joita verrattiin M+0 molekyyliin aikapisteissä 1, 3, 6 ja 24 tuntia. Tämän vertailun tarkoituksena oli vertailla, kuinka ihmisen lihassolut tuottavat täysin tai lähes täysin leimaantuneita aminohappoja. Saatujen mittaustulosten perusteella voitiin tehdä johtopäätöksiä aineenvaihduntareittien virtausnopeuksista eli fluksista, kun tarkasteltiin kuinka paljon aminohappojen aineenvaihduntareitit, tuottivat haluttuja isotopologeja verrattuna leimaamattomaan M+0 isotopologiin.

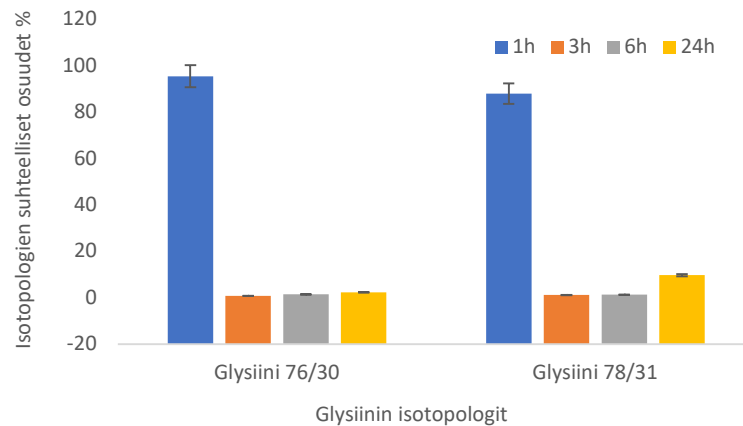
Taulukko 10. Tutkimuksen kannalta oleelliset aminohapot ja niiden isotopologit

Aminohappo	Isotopologit
Seriini	M+3
Alaniini	M+3
Glysiini	M+2
Asparagiini	M+1-4
Aspartaatti	M+1-4
Glutamiini	M+1-4
Glutamaatti	M+1-4
Prolini	M+1-4

Alaniinin M+3 sekä glysiinin M+2 isotopologien runsaudet verrattuna niiden M+0 isotopologiin havainnollistettiin tutkimuksessa kuvaajien avulla (kuvat 33 ja 34). Kuvaajissa käytettiin isotopologien suhteellisia prosenttiosuuksia ja verrattiin näitä toisiinsa ajan funktiona. Kuvaajista voitiin havaita alaniinin kohdalla, että suhteessa M+0 isotopologiin M+3 suhteellinen prosenttiosuus kasvaa progressiivisesti sitä mukaa mitä pidemmälle ajan suhteen edetään. Puolestaan M+0 isotopologin suhteellinen prosenttiosuus pienenee suhteessa M+3 ajan kasvaessa. Kuten jo aikaisemmin mainittiin, tämän havainnon perusteella voidaan todeta, että alaniinin aineenvaihduntareitin virtausnopeus on tehokkaampi suhteessa muihin aminohappojen aineenvaihduntareitteihin. Ero eri aminohappojen aineenvaihduntareittien virtausnopeuksissa voidaan havaita glysiinin kuvaajassa, jossa M+0 sekä M+2 tuottaminen on hyvin tehokassa 1 tunnin aikana, kunnes tuotanto hidastuu merkittävästi jo 3 tunnin jälkeen. Tämä kertoo siitä, että glysiinin aineenvaihduntareitin toiminta hidastuu eli virtausnopeus laskee suhteessa aikaan. Muiden aminohappojen, seriinin, asparagiinin, aspartaatin, glutamiinin, glutamaatin ja proliinin, kiinnostuksen kohteina olevien isotopologien suhteellisten prosenttiosuuksien vertailu M+0 isotopologiin on esitetty kuvaajien avulla liitteessä 2.



Kuva 33. Alaniinin M+3 (93/46) isotopologin suhteellinen prosenttiosuus verrattuna M+0 (90/44) isotopologin suhteelliseen prosenttiosuuteen ajan suhteen.



Kuva 34. Glysiinin M+3 (78/31) isotopologin suhteellinen prosenttiosuus verrattuna M+0 (76/30) isotopologin suhteelliseen prosenttiosuuteen ajan suhteen.

9. Yhteenveto

Kokeellisen osan tarkoituksena oli perehtyä ihmisen sekä hiiren lihassolunäytteiden soluviljelyyn, näytteiden keräykseen sekä näytteiden analysointiin UHPLC-QQQ-MS-laitteistoa hyödyntäen. Tutkimuksessa perehdyttiin lihassolujen aineenvaihduntareitteihin sekä kiinnostuksen kohteena olevien aminohappojen tuottamiseen tietyissä aikapisteissä. Näytteiden analysoinnin osalta tutkimuksessa keskityttiin ensin optimoimaan analyttistä menetelmää

kuoppatestin sekä aikapistevertailun avulla. Kun menetelmä oli saatu optimoitua, mittauksiin sopivaksi, analysoitiin ihmisen lihassolunäytteistä aineenvaihduntareittien virtausnopeutta eli fluksomiikkaa. Fluksomiikan tutkimisessa hyödynnettiin isotooppileimausta, jossa ihmisen lihassolujen annettiin vaikuttaa ^{13}C -isotooppileimatun glukoosiliuoksen kanssa eri pituisia aikoja. Isotooppileimattuja glukoosiliuoksia valmistettiin kahta erilaista, joissa niiden pitoisuuksia säädettiin kahden seerumin (HS- ja FBS-seerumi) avulla. Eri pitoisuuksien tarkoituksena oli stimuloida ihmisen lihassolujen aineenvaihduntareittejä ja tarkoituksena oli analysoida, onko isotooppileimatun glukoosiliuoksen väkevyydellä merkittävää vaikutusta aminohappojen tuotantoon.

Menetelmän kehityksessä isossa roolissa oli selvittää, kuinka kuoppien määrä näytettä kohden sekä aikapisteet vaikuttavat saatuihin mittaustuloksiin. Kuoppatestin avulla pyrittiin selvittämään mikä kuoppamäärä näytettä kohden soveltuisi parhaiten tuottamaan luotettavia sekä riittävän runsaita mittaustuloksia. Testissä käytettiin hiiren lihassoluista kerättyjä näytteitä, joihin oli näytettä kohde kerätty 1, 2 tai 3 kuoppaa. Testin tuloksena todettiin, että kaksi kuoppaa näytettä kohden on riittävä ja järkevästi kerättävissä oleva määrä tuottamaan tutkimuksen kannalta luotettavia sekä riittävän runsaita ioneja. Kuoppatestin lisäksi menetelmän kehityksessä nousi isoon rooliin aikapistevertailu, jota tehtiin kokeellisen osan alussa 2, 4 sekä 6 tunnin aikapisteissä. Aikapistevertailun tarkoituksena oli havainnoida lihassoluissa ilmenevää fluksomiikkaa eli aineenvaihduntareittien virtausnopeuksia. Virtausnopeuksia analysoitiin mittaamalla näytteistä tiettyjä aminohappoja kussakin aikapisteessä. Aikapistevertailu tehtiin kokeellisen osan alussa hiiren lihassolunäytteistä, jotka oli valmistettu siten, että lihassolujen oli annettu vaikuttaa ^{13}C -isotooppileimatun glukoosiliuoksen kanssa, joko 2, 4 tai 6 tuntia. Hiiren lihassolunäytteille tehtyjen aikapistevertailujen tuloksena todettiin, että ajalla on merkittävä vaikutus tiettyjen aminohappojen muodostumiseen ajan suhteessa. Kuitenkin tuloksissa oli huomioitavaa se, että joidenkin aminohappojen osalta aineenvaihduntareittien virtausnopeus laski suhteessa aikaan, jolloin aminohappoja ja niiden isotopologeja muodostui suhteessa vähemmän.

Kun menetelmä oli saatu optimoitua mittauksia varten, mitattiin kokeellisen osan loppupuolella tutkimuksen kannalta tärkeimmät näytteet eli ihmisen lihassolunäytteet. Näille lihassolunäytteille tehtiin aikapistevertailu 1, 3, 6 ja 24 tunnin aikapisteissä sekä tarkasteltiin eri väkevyisten seerumien vaikutusta aminohappojen ja niiden eri isotopologioiden

muodostumiseen ajan funktiona. Varsinaisten näytteiden analysoinnissa aikapistevertailu tehtiin samalla tapaa, miten se oli suoritettu hiiren lihassolunäytteillä 2, 4 ja 6 tunnin aikapisteissä. Kuitenkin tässä aikapistevertailussa tarkastelujaksoa kasvatettiin, jolloin voitiin havaita pidemmän ajan vaikutus aminohappojen muodostumiseen sekä tehdä tulkintoja aineenvaihduntareittien virtausnopeuksista. Aikapistevertailun lisäksi näytteiden annettiin vaikuttaa kahden eri vahvuisen ^{13}C -isotooppileimatun glukoosiliuoksen kanssa (joissa kahta eri seerumia, eri määriä) ja analysoitiin, oliko niillä stimuloivaa vaikutusta muodostuneiden aminohappojen runsauteen.

Aikapistevertailun osalta voitiin todeta sama mitä todettiin hiiren lihassoluille tehdyssä aikapistevertailussa eli ajalla oli merkittävä vaikutus tiettyjen aminohappojen ja niiden isotopologien muodostumiseen ajan suhteen. Kuitenkin merkittävää oli se, että tätä havaintoa ei nähty kuitenkaan kaikkien tarkastelussa olevien aminohappojen osalta. Fluksomiikan näkökulmasta tämä kertoi siitä, että osa aminohappojen aineenvaihduntareiteistä toimii huomattavasti vilkkaammin mitä toiset. Puolestaan kahden eri väkevyyden seerumin stimuloivasta vaikutuksesta, aminohappojen muodostumiseen, ei löydetty yksiselitteisesti merkittävää eroa etenkin aikapisteyden 1- 6 h osalta.

Kokonaisuudessaan pro gradu -tutkimuksen kokeellisen osan tavoitteena oli tutkia fluksomiikkaa ihmisen lihassolunäytteistä ja tehdä havaintoja aiheesta aikapistevertailun sekä seerumistimuloinnin avulla. Kokonaisuudessaan tämä asetettu tavoite saavutettiin tutkimuksen kokeellisessa osassa ja siitä saatujen mittaustulosten avulla voitiin tehdä merkittäviä havaintoja aminohappojen aineenvaihduntareiteistä ja niiden virtausnopeuksista. Mittaustulokset tuottivat haluttuja sekä ennalta oletettuja tuloksia. Kuitenkin saatujen mittaustulosten luotettavuuden ja toistettavuuden kannalta, tulevaisuudessa tutkimusta olisi hyvä jatkaa toistamalla tehdyt analyysit ihmisen lihassolunäytteille.

10. Kirjallisuusuuttelo

- (1) Kelly, R. S., Kelly, M. P., Kelly, P., Metabolomics, Physical Activity, Exercise and Health: A Review of the Current Evidence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **2020**, 1866 (12), 165936.
- (2) Aderemi, A. V., Ayeleso, A. O., Oyedapo, O. O., Mukwevho, E., Metabolomics: A Scoping Review of Its Role as a Tool for Disease Biomarker Discovery in Selected Non-Communicable Diseases, *Metabolites*, **2021**, 11 (7).
- (3) Emwas, A.-H., Szczepski, K., Al-Younis, I., Lachowicz, J. I., Jaremko, M., Fluxomics - New Metabolomics Approaches to Monitor Metabolic Pathways, *Front Pharmacol*, **2022**, 13, 805782.
- (4) Storey, K. B., *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, John Wiley & Sons, Newark, United States, 2004.
- (5) Kalori on kalori vai onko sittenkään?, Lihastohtori, <https://lihastohtori.wordpress.com/2021/04/02/kalorit/> (1.7.1014).
- (6) Heino, J., Vuento, M., Heino, J., *Biokemia ja solubiologia*, 1.-2. painos., Sanoma Pro Oy, Helsinki, 2020.
- (7) Lithaw, P. N., *Glycolysis: Regulation, Processes and Diseases*, Nova Science Publishers, New York, United States, 2009.
- (8) Salway, J. G., *Medical Biochemistry at a Glance*, John Wiley & Sons, Newark, United Kingdom, 2012.
- (9) Rao, N. M., *Medical Biochemistry*, New Age International Ltd, Daryaganj, India, 2006.
- (10) Campbell, N. A., *Biology: A Global Approach, Global Edition*, Pearson Education, United Kingdom, 2014.
- (11) Fromm, H. J., Hargrove, M., *Essentials of Biochemistry*, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, 2012.
- (12) Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M. C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N.-M., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J. D., Ralser, M., The Return of Metabolism: Biochemistry and Physiology of the Pentose Phosphate Pathway, *Biological Reviews*, **2015**, 90 (3), 927–963.
- (13) Nielsen, J., Systems Biology of Metabolism, *Annual Review of Biochemistry*, **2017**, 86 (1), 245–275.
- (14) De Falco, B., Giannino, F., Carteni, F., Mazzoleni, S., Kim, D.-H., Metabolic Flux Analysis: A Comprehensive Review on Sample Preparation, Analytical Techniques, Data Analysis, Computational Modelling, and Main Application Areas, *RSC Adv.*, **2022**, 12 (39), 25528–25548.

- (15) Bluck, L., Volmer, D. A., The Role of Naturally Occurring Stable Isotopes in Mass Spectrometry, Part I: The Theory, *Spectroscopy (Springf)*, **2009**, 23 (10), 36.
- (16) Collins, S. L., Koo, I., Peters, J. M., Smith, P. B., Patterson, A. D., Current Challenges and Recent Developments in Mass Spectrometry–Based Metabolomics, *Annual Rev. Anal. Chem.*, **2021**, 14 (1), 467–487.
- (17) Patel, R., Roy, M., Dutta, G., Mass Spectrometry- A Review., *Vet. World*, **2012**, 185.
- (18) Ren, J.-L., Zhang, A.-H., Kong, L., Wang, X.-J., Advances in Mass Spectrometry-Based Metabolomics for Investigation of Metabolites, *RSC Adv.*, **2018**, 8 (40), 22335–22350.
- (19) Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A. M., Kraj, A., Desiderio, D. M., Nibbering, N. M., *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*, John Wiley & Sons, Newark, United States, 2008.
- (20) Awad, H., Khamis, M. M., El-Aneed, A., Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization, *Applied Spectroscopy Reviews*, **2015**, 50 (2), 158–175.
- (21) Wilm, M., Principles of Electrospray Ionization, *Molecular & Cellular Proteomics*, **2011**, 10 (7), M111.009407.
- (22) Konermann, L., Ahadi, E., Rodriguez, A. D., Vahidi, S., Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization, *Anal. Chem.*, **2013**, 85 (1), 2–9.
- (23) El-Aneed, A., Cohen, A., Banoub, J., Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers, *Applied Spectroscopy Reviews*, **2009**, 44 (3), 210–230.
- (24) MALDI Basics. <https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/maldi/index.html> (1.7.2024).
- (25) Li, C., Chu, S., Tan, S., Yin, X., Jiang, Y., Dai, X., Gong, X., Fang, X., Tian, D., Towards Higher Sensitivity of Mass Spectrometry: A Perspective from the Mass Analyzers, *Front Chem*, **2021**, 9, 813359.
- (26) Allen, D. R., McWhinney, B. C., Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications, *Clin. Biochem. Rev.*, **2019**, 40 (3), 135–146.
- (27) Chernushevich, I. V., Loboda, A. V., Thomson, B. A., An Introduction to Quadrupole–Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, **2001**, 36 (8), 849–865.
- (28) Xie, C., Zhong, D., Yu, K., Chen, X., Recent Advances in Metabolite Identification and Quantitative Bioanalysis by LC–Q-TOF MS, *Bioanalysis*, **2012**, 4 (8), 937–959.
- (29) Maurer, H. H., Meyer, M. R., High-Resolution Mass Spectrometry in Toxicology: Current Status and Future Perspectives. *Arch Toxicol*, **2016**, 90 (9), 2161–2172.
- (30) Alsaleh, M., Barbera, T. A., Andrews, R. H., Sithithaworn, P., Khuntikeo, N., Loilome, W., Yongvanit, P., Cox, I. J., Syms, R. R. A., Holmes, E., Taylor–Robinson, S. D.,

Mass Spectrometry: A Guide for the Clinician, *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, **2019**, 9 (5), 597–606.

(31) Pitt, J. J., Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry, *Clin. Biochem. Rev.*, **2009**, 30 (1), 19–34.

(32) Zhou, J., Yin, Y., Strategies for Large-Scale Targeted Metabolomics Quantification by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Analyst.*, **2016**, 141 (23), 6362–6373.

(33) Eliuk, S., Makarov, A., Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation, *Annual Review of Analytical Chemistry*, **2015**, 8 (Volume 8, 2015), 61–80.

(34) Scigelova, M., Makarov, A., Orbitrap Mass Analyzer – Overview and Applications in Proteomics, *PROTEOMICS*, **2006**, 6 (S2), 16–21.

(35) Hoffmann, E. de, Stroobant, V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3. painos, Wiley, Hoboken, NJ, United Kingdom, 2007.

(36) Thomas, S. N., French, D., Jannetto, P. J., Rappold, B. A., Clarke, W. A., Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for Clinical Diagnostics, *Nat. Rev. Methods Primers*, 2022, 2 (1), 1–14.

(37) Rathod, R. H., Chaudhari, S. R., Patil, A. S., Shirkhedkar, A. A., Ultra-High Performance Liquid Chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in Practice: Analysis of Drugs and Pharmaceutical Formulations, *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2019**, 5 (1), 6.

(38) Schwaiger-Haber, M., Stancliffe, E., Arends, V., Thyagarajan, B., Sindelar, M., Patti, G. J., A Workflow to Perform Targeted Metabolomics at the Untargeted Scale on a Triple Quadrupole Mass Spectrometer, *ACS Meas. Sci. Au.*, **2021**, 1 (1), 35–45.

(39) Wang, X., Luo, C., Xu, L., Wang, Y., Guo, L. J., Jiao, Y., Deng, H., Liu, X., Development of Pseudo-Targeted Profiling of Isotopic Metabolomics Using Combined Platform of High Resolution Mass Spectrometry and Triple Quadrupole Mass Spectrometry with Application of ¹³C₆-Glucose Tracing in HepG2 Cells. *Journal of Chromatography A*, **2023**, 1696, 463923.

(40) Beale, D. J., Pinu, F. R., Kouremenos, K. A., Poojary, M. M., Narayana, V. K., Boughton, B. A., Kanojia, K., Dayalan, S., Jones, O. A. H., Dias, D. A., Review of Recent Developments in GC–MS Approaches to Metabolomics-Based Research, *Metabolomics*, **2018**, 14 (11), 152.

(41) Wittmann, C., Fluxome Analysis Using GC-MS, *Microb. Cell. Fact.*, **2007**, 6 (1), 6.

(42) Zeki, Ö. C., Eylem, C. C., Reçber, T., Kır, S., Nemitlu, E., Integration of GC–MS and LC–MS for Untargeted Metabolomics Profiling, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2020**, 190, 113509.

(43) Markley, J. L., Brüschweiler, R., Edison, A. S., Eghbalnia, H. R., Powers, R., Raftery, D., Wishart, D. S., The Future of NMR-Based Metabolomics, *Current Opinion in Biotechnology*, **2017**, 43, 34–40.

- (44) Marion, D., An Introduction to Biological NMR Spectroscopy, *Molecular & Cellular Proteomics*, **2013**, 12 (11), 3006–3025.
- (45) P. Gerothanassis, I., Troganis, A., Exarchou, V., Barbarossou, K., Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: basic principles and phenomena, and their applications to chemistry, biology and medicine, *Chemistry Education Research and Practice*, **2002**, 3 (2), 229–252.
- (46) Separation of Pentose Phosphate Pathway, Glycolysis, and Energy Metabolites Using an ACQUITY Premier System with an Atlantis Premier BEH Z-HILIC Column, www.waters.com/nextgen/lv/en/library/application-notes/2021/separation-of-pentose-phosphate-pathway-glycolysis-and-energy-metabolites-using-an-acquity-premier-system-with-an-atlantis-premier-beh-z-hilic-column.html, (31.7.2024)

11. Liitteet

1. Negatiiviselle ja positiiviselle polarisaatiolle valmistettujen standardiliuosten reagenssit ja puhtausasteet.
2. Puskuriliuostestin tulokset positiivisella sekä negatiivisella polarisaatiolla mitattuna (sisältäen pinta-alojen keskiarvo, muutoksen prosentuaalinen osuus ja muutoksen prosentuaalinen keskiarvo sekä suhteellinen keskihajonta).
3. Seriinin M+3 sekä aspartaatin, asparagiinin, proliinin, glutamaatin ja glutamiinin M + 1-4 isotopologiin runsaudet verrattuna leimaamattomaan M+0 isotopologiin.

LIITE 1

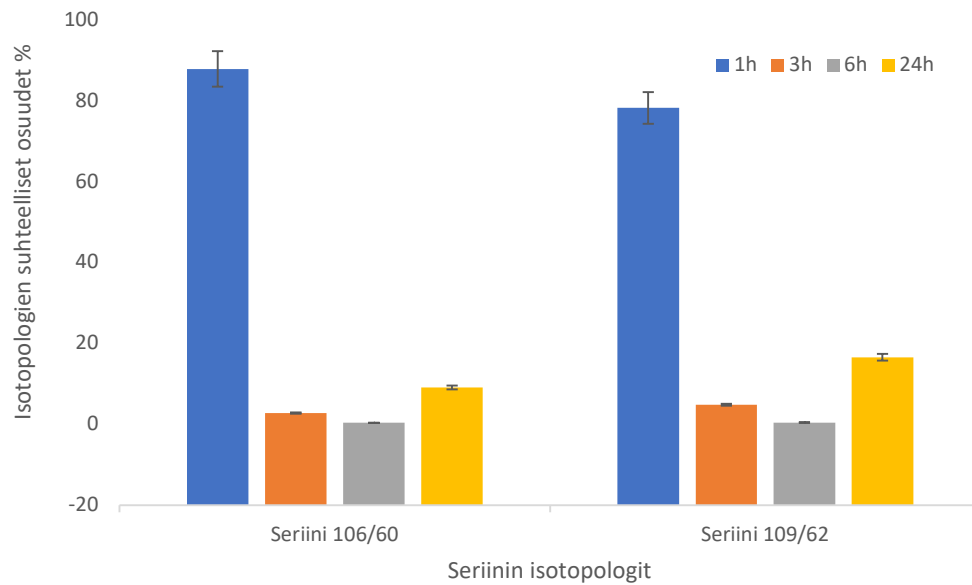
Standardiliuos (neg.)		Standardiliuos (pos.)	
reagenssi	puhtausaste	reagenssi	puhtausaste
2-Oxoglutaric Acid	≥99 %	Adenosine	99 %
3-Hydroxybutyrate sodium salt	≥98 %	Glycine	98,5 %
6-Phosphogluconic acid trisodium salt	≥97 %	L-3-Aminoisobutyric acid	≥97 %
Acetyl coenzyme A sodium salt	≥93 %	L-Alanine	99 %
Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate	≥99 %	L-Arginine	99 %
Adenosine 5'-Diphosphate monopotassium salt dihydrate	≥95 %	L-Asparagine Anhydrous	98 %
Adenosine-5'-monophosphate disodium salt	≥98 %	L-Aspartic Acid	99 %
Citric acid	≥99 %	L-Cysteine	98 %
Creatine phosphate disodium salt tetrahydrate	≥98 %	L-Glutamic acid	99 %
Creatine	≥99 %	L-Glutamine	99 %
D-(-)-3-Phosphoglyceric acid disodium salt	≥93 %	L-Histidine	98 %
D-(+)-Glucono-1,5-lactone	≥98 %	L-Isoleucine	98,5 %
D-Erythrose 4-phosphate sodium salt	≥50 %	L-Leucine	98,5 %
D-Fructose 6-phosphate dipotassium salt	≥97 %	L-Lysine	97 %
D-Fructose-1,6-bisphosphate trisodium salt	-	L-Methionine	99 %
D-Glucose 6-phosphate disodium salt hydrate	≥98 %	L-Norvaline	99 %
Dihydroxyacetone phosphate	≥93 %	L-Phenylalanine	98 %
D-Ribose-5-phosphate disodium salt hydrate	-	L-Proline	99 %
D-Ribulose 5-phosphate disodium salt	≥96 %	L-Serine	98,5 %
Fumaric acid	≥99 %	L-Threonine	99 %
Guanosine 5'-Monophosphate hydrate	≥98 %	L-Tryptophan	98 %
Inosine-5'-monophosphate disodium salt hydrate	≥98 %	L-Tyrosine	98,5 %
L-(-)-Malic Acid	≥98 %	L-Valine	98,5 %
Phospho(enol)pyruvic acid monopotassium salt	≥97 %	O-Phospho-L-serine	-
Sodium (S)-β-hydroxyisobutyrate	≥96 %	β-Alanine	99 %
Sodium L-Lactate	≈98 %		
Sodium Pyruvate	≥97 %		
Succinic acid	≥99 %		
Uridine 5'-monophosphate disodium salt	≥99 %		
Uridine-5'-diphosphate disodium salt	≥98 %		
Uridine-5'-triphosphate trisodium Salt	≥97 %		

Positiivisella polarisaatiolla saadut mittaustulokset

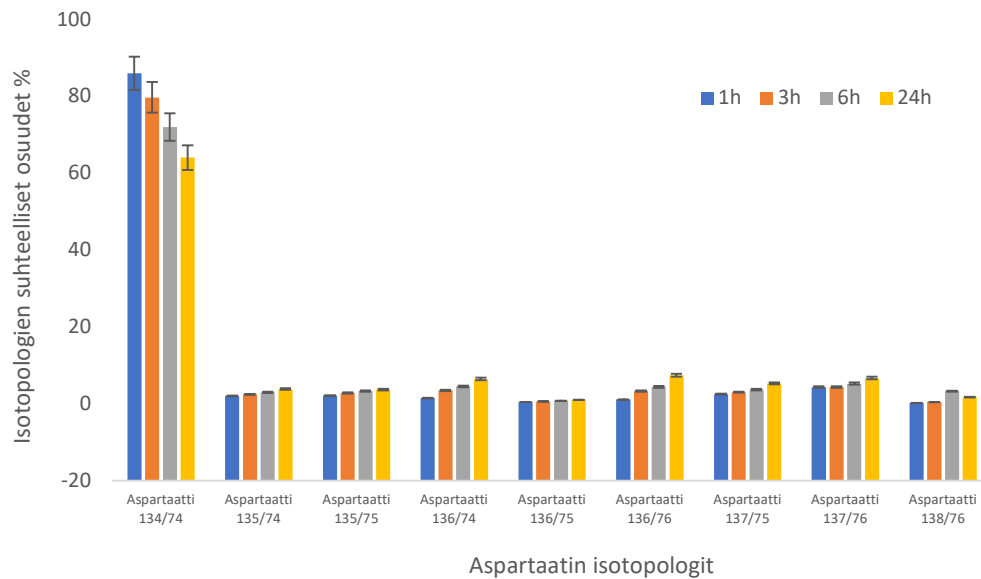
Muutoksen suuruus prosentuaalisesti (15 mM - 23.5 mM)/15mM*100%				
	15mM	23.5 mM		
	Average Area	Average Area		Muutos (%) (15 mM -23.5 mM)/15 mm*100%
13C4-Aspartate (ISTD)	636,14	457,63		28,061433
Alanine	48499	28452,5		41,333842
Arginine	453902	246952,5		45,593432
Asparagine	7178,25	5460,36		23,931878
Aspartate	2364,585	1582,14		33,090162
BAIBA	28284,5	19227		32,022839
Beta-Alanine	105132	64574,5		38,577693
Glutamate	33970	20274,95		40,315131
Glutamine	174477,5	117611,5		32,592168
Glycine	537,03	285,605		46,817682
Isoleucine	406624,5	265212		34,777172
Leucine	206564,5	135229		34,53425
Lysine	39733	21315,5		46,353157
Methionine	75991,755	54718,5		27,994162
Phenylalanine	462693	346952,5		25,014534
Phospho-serine	772,21	495,895		35,782365
Proline	1287303,5	877399		31,842103
Serine	6953	3705,82		46,701855
Threonine	34366	24269		29,380783
Tryptophan	406773,5	289316,5		28,875283
Tyrosine	9644,78	6593		31,641779
Valine	1002190,5	679388,5		32,209645
			Keskiarvo	34,883789
			Keskihajonta	7,0214854

Negatiivisella polarisaatiolla saadut mittaustulokset

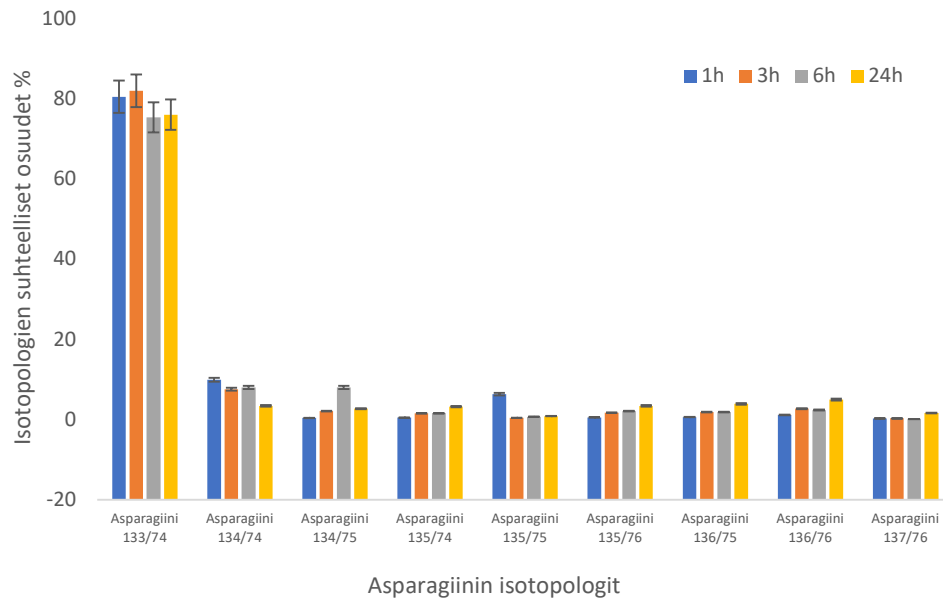
Muutoksen suuruus prosentuaalisesti (15 mM - 23.5 mM)/15mM*100%				
	15 mM	23.5 mM		
Metabolite	Average Area	Average Area		Muutos (%) (15 mM -23.5 mM)/15 mm*100%
2-oxoglutarate_101.1	4457,07	3829,906667		14,07120223
2-Oxoglutarate_57.1	1454,556667	1236,013333		15,02473835
3-HB	231,18	220,24		4,732243274
Acetyl-CoA	994,33	987,78		0,658735028
AMP	1551,106667	1407,093333		9,284553824
Cyclic-AMP	28500,62667	22166,10667		22,22589726
Creatine	861,5966667	899,16		-4,35973522
Creatine-Phosphate	562,1666667	536,0233333		4,650459532
Dihydroxyacetone phospho	402,9766667	354,51		12,02716452
Fructo 6-phosphate	854,8566667	619,1866667		27,56836429
Glucose 6-phosphate	546,2833333	473,8033333		13,26784025
Fumarate	319,7566667	353,1266667		-10,43606075
GMP	773,5833333	680,2066667		12,07066681
IMP	733,0766667	649,8666667		11,35079096
Lactate	88,54666667	83,76666667		5,398283391
13C3-Lactate (Smooth)	28,68666667	28,21		1,66163142
Phosphoenolpyruvate	431,8766667	414,5933333		4,001914127
Pyruvate	75,71333333	67,31666667		11,0900766
Ribulose 5-phosphate	963,7033333	652,0033333		32,34397861
Ribose 5-phosphate	781,51	569,2533333		27,15981455
Succinate	642,12	426,0273333		33,65300359
UMP	1358,33	950,14		30,05087129
			Keskiarvo	12,61347427
			Keskihajonta	11,99530529



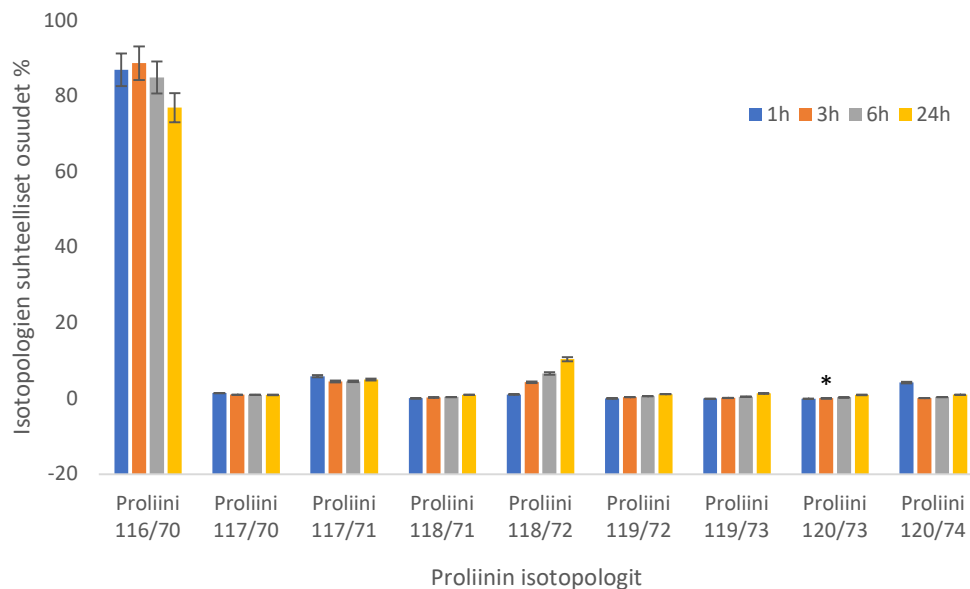
Seriinin M+3 (109/62) isotopologin suhteellinen prosenttiosuus verrattuna M+0 (106/60) isotopologin suhteelliseen prosenttiosuuteen ajan suhteen.



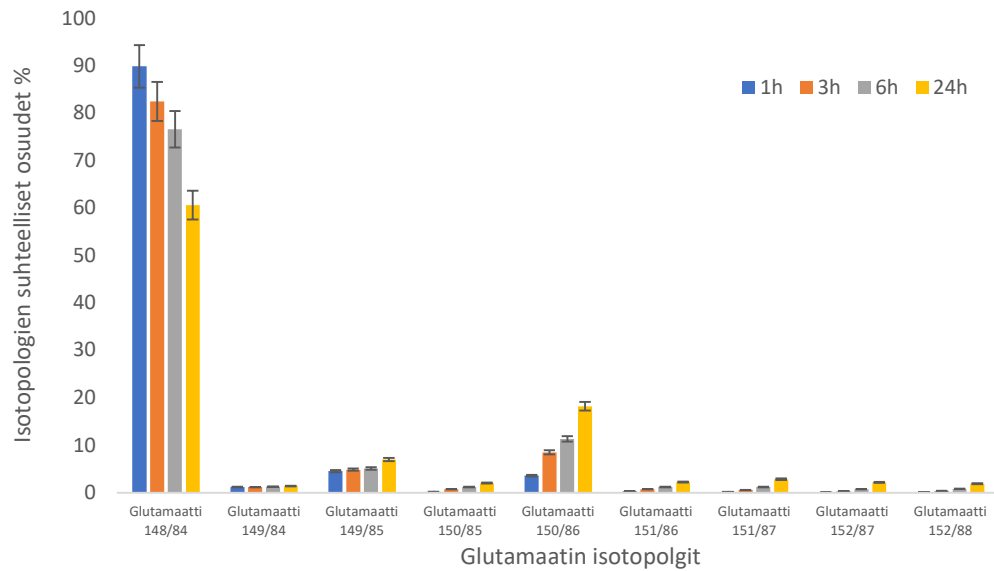
Aspartaatin M+1 (135/74 ja 135/75), M+2 (136/74, 136/75 ja 136/76), M+3 (137/75 ja 137/76) ja M+4 (138/76) isotopologin suhteellinen prosenttiosuus verrattuna M+0 (134/74) isotopologin suhteelliseen prosenttiosuuteen ajan suhteen.



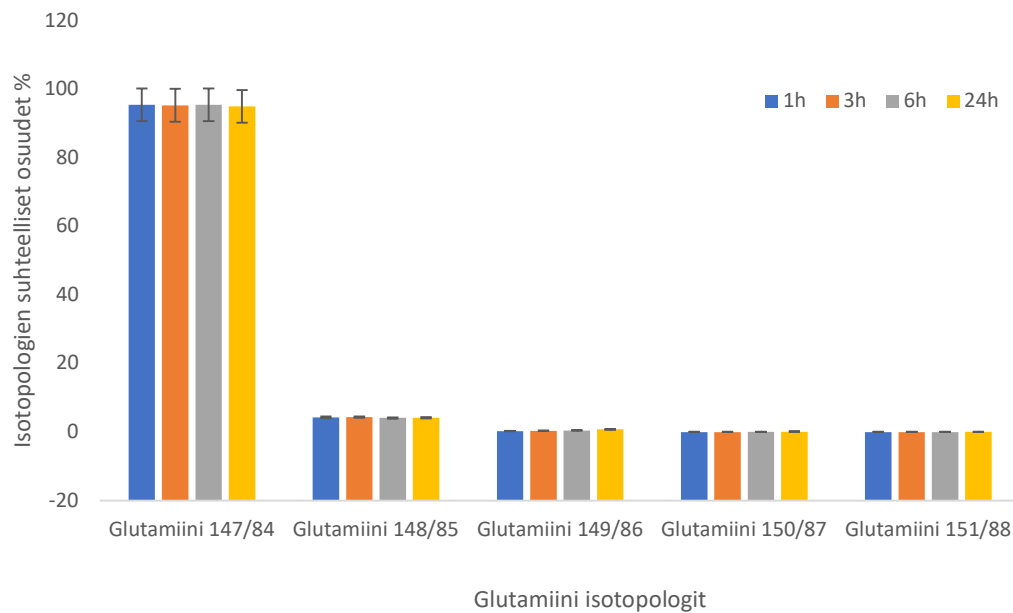
Asparagiinin M+1 (134/74 ja 134/75), M+2 (135/74, 135/75 ja 135/76), M+3 (136/75 ja 136/76) ja M+4 (137/76) isotopologin suhteellinen prosenttiosuus verrattuna M+0 (133/74) isotopologin suhteelliseen prosenttiosuuteen ajan suhteen.



Proliinin M+1 (117/70 ja 117/71), M+2 (118/71 ja 118/72), M+3 (119/72 ja 119/73) ja M+4 (120/73 ja 120/74) isotopologin suhteellinen prosenttiosuus verrattuna M+0 (116/70) isotopologin suhteelliseen prosenttiosuuteen ajan suhteen. (*Tämä isotopologi oli jonkun muun yhdisteen



Glutamaatin M+1 (149/84 ja 149/85), M+2 (150/85 ja 150/86), M+3 (151/86 ja 151/87) ja M+4 (152/87 ja 152/88) isotopologin suhteellinen prosenttiosuus verrattuna M+0 (148/84) isotopologin suhteelliseen prosenttiosuuteen ajan suhteen.



Glutamiinin M+1 (148/85), M+2 (149/86), M+3 (150/87) ja M+4 (151/88) isotopologin suhteellinen prosenttiosuus verrattuna M+0 (147/84) isotopologin suhteelliseen prosenttiosuuteen ajan suhteen.