



CHALMERS

Laktatmetabolism under fysisk ansträngning

Kandidatarbete KBTX10-17-13

Datum: 12 maj 2017

OSCAR ASPELIN
SÜMEYYA DÖKÜMCÜ
LOVISA ERIKSSON
BEATRICE HALLGREN
HEKLA HJALMARSOTTIR
ADAM PALMGREN

Handledare: Gunnar Westman

Institutionen för Kemi och bioteknik
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2017

Förord

Denna studie genomfördes våren 2017 på Institutionen för Kemi- och kemiteknik vid Chalmers Tekniska Högskola. Studien är framtagen och utarbetad från grunden av oss studenter i projektgruppen, och oss veterligen har ingen liknande studie tidigare genomförts vid Chalmers Tekniska Högskola. Idén föddes ur en dröm om att kombinera studier med idrottsvetenskap i hopp om att skapa bättre förutsättningar för idrottare. Tillsammans hade vi en vision som genom samarbete och engagemang gjorde drömmen möjlig.

Vi vill tacka vår handledare Gunnar Westman som gjorde det möjligt att starta upp projektet. Vi vill även rikta ett stort tack till följande personer och organisationer som stöttat oss under projektets gång:

Carl Jenner
Christer Larsson
Claes Niklasson
CMSI
Elsa Eriksson
Erik Tunström
Eva Albers
Johan Wallberg
Lynga Normann Huang
Marie Alminger
Mohammadreza Tamadondar
NEC
Otto Savolainen
Simklubben Neptun
Simmare vid NEC

Sammanfattning

Laktat produceras under fysisk ansträngning vid anaeroba förhållanden för att kompensera för den energibrist som uppstår i musklerna. Laktat har under lång tid ansetts påverka prestationsförmågan negativt, men ny forskning tyder på att laktat endast är en biomarkör för trötthet snarare än en direkt orsak.

Syftet med studien var att undersöka om matematiska korrelationer existerar mellan koncentrationen av laktat och andra metaboliter som är involverade i laktatmetabolism. Detta gjordes genom att analysera blodprov från fyra olika simmare under fysisk ansträngning. Analysen av blodproverna gjordes med GC-MS, vilket resulterade i 90 identifierade metaboliter. En multivariat dataanalys gjordes sedan för att undersöka huruvida metaboliterna korrelerade med laktat. Utifrån analysen identifierades 30 signifikanta metaboliter som, hos alla fyra simmare, korrelerade starkt med laktat.

Resultatet bekräftar att korrelationer mellan laktat och ett antal metaboliter existerar. Det är däremot svårt att avgöra om de signifikanta metaboliterna är direkt involverade i laktatmetabolism på grund av dess komplexitet. De signifikanta korrelationerna kan eventuellt ligga till grund för framtida forskning inom prestationsoptimering.

Abstract

Lactate is produced during physical exercise in order to compensate for the inadequate muscular energy supply when the conditions are anaerobic. Lactate has for a long time been considered to affect physical performance negatively, but new studies indicate that lactate is only a biomarker for exhaustion rather than an immediate cause.

The purpose of this study was to examine if mathematical correlations exist between the concentration of lactate and other metabolites involved in lactate metabolism. This was implemented by analyzing blood samples from four different swimmers during physical exercise. The blood analysis was performed using GC-MS and resulted in 90 different identified metabolites. A multivariate data analysis was then executed as a way of examining if the metabolites correlated with lactate. Based on this analysis, 30 significant metabolites were identified that in all four swimmers strongly correlated with lactate.

The results confirm that correlations between lactate and several metabolites exist. It is, on the other hand, very difficult to determine if the significant metabolites are directly involved in lactate metabolism because of its complex dynamics. The significant correlations might establish a foundation for future studies within performance optimization.

Innehållsförteckning

1. Inledning	1
1.1. Bakgrund.....	1
1.2. Syfte.....	1
2. Teori	2
2.1. Metabolism.....	2
2.1.1. Glykolysen.....	2
2.1.2. Glukoneogenesen.....	3
2.1.3. Citronsyrcykeln.....	4
2.1.4. Elektrontransportkedjan.....	5
2.1.5. Laktat.....	5
2.1.6. Blod.....	6
2.2. Metabolomik.....	7
2.3. Gaskromatografi.....	7
2.4. Masspektrometri.....	8
2.4.1. Jonisering.....	9
2.4.2. Separation.....	9
2.4.3. Detektion.....	9
2.4.4. Masspektrum.....	10
2.5. Multivariat dataanalys.....	10
2.5.1. PCA.....	10
2.5.2. PLS.....	11
2.5.3. Korrelation och kausalitet.....	12
3. Metod	13
3.1. Etikprövning.....	13
3.2. Provtagning.....	13
3.2.1. Provtagning – testomgång.....	13
3.2.2. Provtagning – Nationellt ElitCentra.....	13
3.3. Analys.....	14
4. Resultat	15
4.1. Laktatkoncentrationer.....	15
4.2. PLS för samtliga metaboliter.....	15
4.3. Korrelationsmatris.....	16
4.4. PLS för signifikanta metaboliter.....	17
5. Diskussion	21
5.1. Analys av resultat.....	21
5.2. Felkällor och förbättringar.....	22
6. Slutsatser	23
7. Projektets framtid	24
Referenser	25
Bilaga 1 – Etikansökan	30
Bilaga 2 – Det upprättade kontraktet	51
Bilaga 3 – Provtagningsprotokoll	54
Bilaga 4 – GC-MS	55
Bilaga 5 – PLS-analyser för samtliga 90 metaboliter	56
Bilaga 6 – Metabolitlista	65
Bilaga 7 – Koefficientsummor för samtliga 90 metaboliter	68
Bilaga 8 – PLS-analyser för de signifikanta metaboliterna	70

1. Inledning

1.1. Bakgrund

Under fysisk ansträngning sker en mängd olika reaktioner i kroppen och de flesta har förmodligen upplevt surheten som uppstår i musklerna under ett hårt träningspass. Detta förknippas ofta med laktat, vilket i vardagligt tal felaktigt kallas mjölksyra. pH-värdet i blod och vävnader förändras på grund av att mjölksyran dissocierar till laktat och vätejoner, vilket ger upphov till surheten i musklerna [1].

Under lång tid har laktat endast ansetts vara en avfallsprodukt vid anaerob träning och har antagits påverka prestationsförmågan negativt genom att orsaka trötthet. På senare tid har förståelsen kring laktat ökat och dess nyckelroll i metabolismen har blivit tydligare, även om många frågor kvarstår. Ny forskning visar dock att laktat är involverat i flera metabola processer samt är en biomarkör för trötthet snarare än en direkt orsak. Laktat har även visat sig ha positiva effekter genom att kompensera för den energibrist som uppstår vid högintensiv träning, vilket därmed gynnar prestationsförmågan [2].

Studien grundar sig i att undersöka laktatmetabolism hos elitidrottare under hög fysisk ansträngning. Fokuset ligger på högintensiv träning eftersom laktatproduktionen antas vara högre än vid låg- och medelintensiv träning. Genom att undersöka korrelationer mellan koncentrationen av laktat och andra metaboliter i blodet kan en djupare förståelse kring metabolismens dynamik erhållas. Med hjälp av denna kunskap kan det vara möjligt att identifiera faktorer som påverkar metabolismen, såsom kost. Detta möjliggör att idrottare skulle kunna kontrollera faktorer som påverkar laktat- och andra metabolitnivåer i syfte att optimera prestationsförmågan.

Undersökningen genomförs på simmare men skulle kunna appliceras på alla träningsformer. Samtliga deltagare i studien är rankade topp 20 genom tiderna i Sverige inom simning [3]. Anledningen till att studien utfördes på elitsimmare är att dessa i jämförelse med amatörsimmare antas ha en högre laktatomsättning, vilket troligtvis ger ett tydligare resultat.

1.2. Syfte

Det primära syftet med studien är att undersöka om det finns korrelationer mellan koncentrationen av laktat och andra metaboliter, involverade specifikt i laktatmetabolism, hos elitsimmare under fysisk ansträngning. Korrelationsanalysen ska utföras genom en multivariat dataanalys i syfte att undersöka vilka metaboliter som påverkar laktatkoncentrationen, vilket kan lägga en grund för framtida forskning inom prestationsoptimering.

2. Teori

2.1. Metabolism

Metabolism är ett sammanfattande begrepp för alla de processer som är involverade i att hålla kroppens celler vid liv samt upprätthålla dess funktioner. Vanligen delas metabolismen in i två olika kategorier som kallas katabolism och anabolism. De katabola processerna innebär nedbrytning av föda och anabolism innebär uppbyggnad av celler. För att de metabola processerna ska kunna ske krävs därmed en kontinuerlig energitillförsel i form av föda. Kroppen arbetar aktivt för att bryta ned födan till mindre föreningar så att näringsämnen skall kunna tillgodogöras i form av energi. Denna energi genereras ofta via produktion av högenergimolekyler, såsom ATP, GTP och NADH, vilka används som drivkraft för många av kroppens anabola processer [4]. De föreningar som bryts ned och omsätts i kroppen kallas metaboliter [5]. Den kompletta uppsättningen av metaboliter i en organism utgör det så kallade metabolomet vilket består av ett stort antal kemiska föreningar [6], [7].

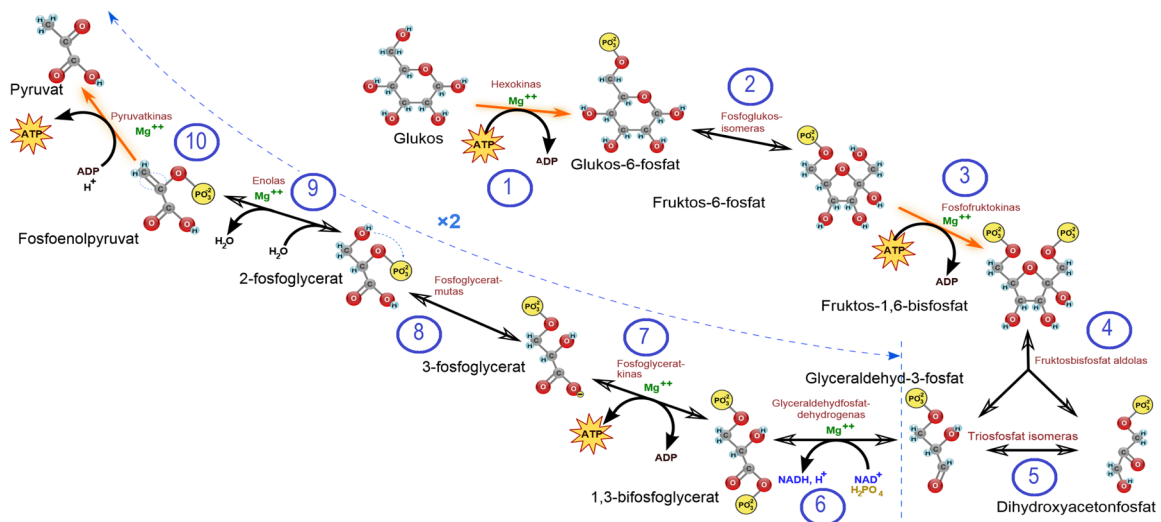
En av de centrala metabola processerna är glykolysen som sker i cellens cytosol, där glukos successivt bryts ned till pyruvat samtidigt som ATP och NADH bildas. Glykolysen kan även ske i omvänd riktning genom att glukos bildas från icke-kolhydrater. Denna process kallas glukoneogenesen och sker anaerobt, alltså utan närvaro av syre. Vid aeroba förhållanden då syre finns tillgängligt omvandlas pyruvat till acetyl-CoA, vilket är det ingående ämnet för citronsyracykeln som sker i mitokondrierna [8]. I citronsyracykeln bildas koenzymerna NADH och FADH₂ samtidigt som energi lagras i form av ATP och GTP. Koenzymerna förbrukas sedan i elektrontransportkedjan för att bilda mer ATP [9], [10].

Vid fysisk ansträngning krävs en högre omsättning av kroppens metaboliter för att konstant kunna tillföra energi till musklerna. Detta innebär att de katabola processerna måste ske i en högre hastighet än vid vila. De flesta energirika föreningar bildas vid närvaro av syre, men vid intensiv fysisk ansträngning kan kroppen i många fall inte syresättas tillräckligt fort för att de aeroba processerna ska kunna producera den energi som krävs. Detta medför att de anaeroba processerna aktiveras och mer laktat produceras. Laktatmetabolism är därför ett viktigt område inom idrotten för att få en ökad förståelse kring hur metaboliter vid anaeroba förhållanden påverkar fysisk prestation [11].

2.1.1. Glykolysen

Glukos används som energi till kroppens celler och är en av människans viktigaste energikällor. Nedbrytning av glukos sker successivt i kroppen för att slutligen bilda koldioxid och vatten. Den inledande katabola processen vid nedbrytning av glukos är glykolysen som äger rum i de flesta av kroppens celler. Glukosmolekylerna transporteras från blodet in till cellernas cytosol, där glykolysen äger rum. I glykolysen bryts glukos ned till pyruvat genom tio enzymatiska reaktioner, varvid energi lagras i form av ATP [4].

I glykolysen sker inledningsvis en energiinvestering genom att ATP förbrukas för att kunna generera mer ATP i glykolysens slutskede. Samtidigt reduceras NAD till NADH. Nettovinsten är två pyruvat, två ATP och två NADH per glukosmolekyl. En detaljerad beskrivning av glykolysens alla delsteg illustreras i Figur 1, där steg 1, 3 och 10 är de viktigaste hastighetsreglerande stegen. Dessa reaktioner är högt exoterma och sker irreversibelt. Resterande steg sker reversibelt [12], [13].



Figur 1 – Schematisk bild över glykolysen. Från [87], omarbetad med tillstånd.

Pyruvat är även en viktig komponent i andra metaboliska processer. Vissa celltyper, såsom muskelceller, kan fungera trots begränsad syretillförsel. Vid anaerob träning omvandlas pyruvat till laktat i cytosolen. Det bildade laktatet utsöndras sedan från muskelcellen. Reaktionen återbildar även NAD från NADH, vilket kan utnyttjas i glykolysens senare del. Dock genereras inte lika mycket energi som vid fullständig nedbrytning [4].

Vid aerob nedbrytning av glukos genereras ungefär tio gånger mer ATP jämfört med anaerob nedbrytning. Detta innebär att det skulle behöva tillföras cirka fyra gram glukos per timme för att upprätthålla hjärnans funktion om glykolysen sker aerobt. Om samma mängd ATP ska genereras från den anaeroba glykolysen skulle cirka 60 gram per timme krävas [11], [14].

Glykolysen stimuleras bland annat av en hög andel kolhydrater i kosten, vid intensiv träning samt genom reglering av de enzymer som är verksamma i processen. Många av dessa enzym regleras av olika metaboliter och hormoner. Det är främst AMP, ADP och defosforylering som aktiverar glykolysen medan ATP, citrat, acetyl-CoA och fosforylering inhiberar processen [12], [15].

2.1.2. Glukoneogenesen

Vid tillfällen när det inte finns tillräckligt mycket glukos kvar i kroppen, till exempel efter en lång natts sömn eller vid högintensiv träning, aktiveras processer för att kompensera för det låga glukosintaget. Glykolysen kan då ske i omvänd riktning, vilket resulterar i att glukos bildas istället för att brytas ned. Processen kallas glukoneogenesen och sker huvudsakligen i levern där glukos bildas från andra källor än kolhydrater såsom glycerol, laktat, alanin och glutamin [13], [16].

Blodets glukoshomeostas är viktig för kroppen eftersom en obalans medför effekter som är livshotande. Glukoskoncentrationen i blodet är därmed hårt reglerad för att hålla en jämn och hälsosam nivå [13], [16]. Den hårda regleringen beror både på att glukos är en nödvändig energikälla för hjärnan samt att glukos är skadligt i högre koncentrationer [16]. Både förhöjda och sänkta nivåer av glukos utlöser hormonella signaler i syfte att återställa balansen [13], [15].

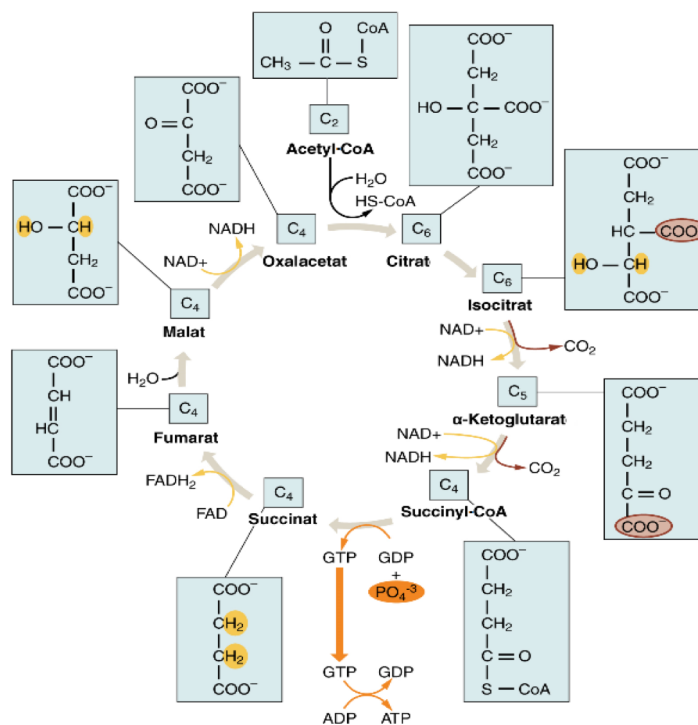
Levern spelar en viktig roll i flera av kroppens metabola processer och har huvudansvaret för att upprätthålla glukoshomeostasen i kroppen. Förutom levern har även njurarna förmågan att genomföra glukoneogenes. Laktat, som är en av prekursorerna till glukoneogenesen, omvandlas först till pyruvat för att kunna ingå i processen [13].

De tre irreversibla stegen i glykolysen gör det omöjligt för glukoneogenesen att ske i identisk omvänd riktning. De irreversibla stegen ersätts istället med andra enzymatiska reaktioner, vilka också är mycket energikrävande [13]. För varje producerad glukosmolekyl förbrukas fyra ATP, två pyruvat och två NADH [12].

Om glykolysen och glukoneogenesen är aktiva på samma gång skulle glukos brytas ned och återbildas samtidigt, vilket medför en onödig förbrukning av ATP. För att undvika detta sker en reciprok reglering av processerna. Det vill säga när glykolysen stimuleras inhiberas glukoneogenesen och tvärtom [13], [15].

2.1.3. Citronsyrcykeln

Citronsyrcykeln är en cyklisk process av kemiska reaktioner där en oxidativ nedbrytning av kolhydrater, fettsyror och aminosyror sker i alla kroppens celler [9]. Pyruvat som bildas i glykolysen kan oxideras till acetyl-CoA, vilket är en av prekursorerna till citronsyrcykeln. Det första steget i cykeln är då acetyl-CoA reagerar med oxalacetat för att bilda citrat, vilket är den deprotonerade formen av citronsyra. Citronsyrcykeln sker därefter i nio efterföljande steg enligt Figur 2. I det sista steget återbildas oxalacetat, vilket är den metabolit som krävs för att processen ska kunna börja om [9], [17].



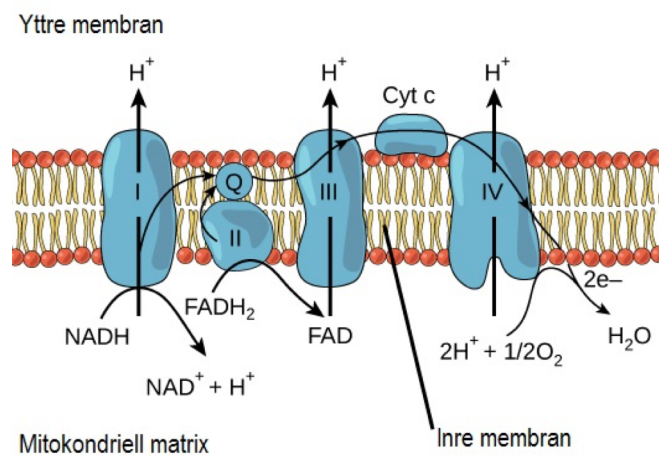
Figur 2 – Citronsyrcykeln. Från [88], omarbetad med tillstånd.

Vissa metaboliter i cykeln fungerar som prekursorer för anabola processer. Stegen i citronsyrcykeln katalyseras av enzymer som är lokaliserade i mitokondriernas matrix [18]. Under en cykel frigörs protoner samtidigt som koenzymerna FAD och NAD reduceras till FADH₂ och NADH [17].

2.1.4. Elektrontransportkedjan

NADH och FADH₂ används för att generera ytterligare energi i form av ATP i elektrontransportkedjan. Processen äger rum i mitokondriens matrix samt i utrymmet mellan det yttre och inre membranet. Koenzymerna bär på reaktiva elektroner med förmågan att binda till sig syre. Elektrontransportkedjan består av ett flertal proteinkomplex lokaliserade i mitokondriens innermembran som aktiveras då koenzymerna frisätter elektroner och det bundna syret. Proteinkomplexen består bland annat av så kallade protonpumpar, det vill säga proteiner som aktivt transporterar protoner från matrixen över mitokondriens innermembran. Pumparna drivs av att elektronerna frisätter energi då de vandrar längs med kedjan [10], [19], [20].

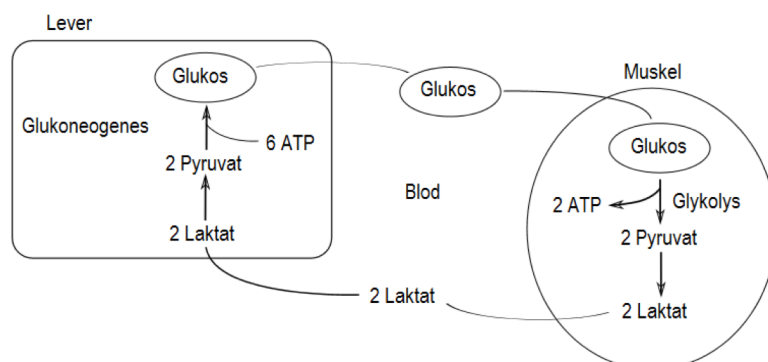
I utrymmet mellan det inre och yttre membranet bildas ett protonöverskott, vilket leder till att protonerna flödar tillbaka in i mitokondrien via proteinet ATP-syntas. Protonflödet tillsammans med ATP-syntas driver produktionen av ATP [20], [21]. Processen är aerob och nästan allt syre kroppen tagit upp förbrukas i denna process [22], [23]. Elektrontransportkedjan illustreras i Figur 3.



Figur 3 – Elektrontransportkedjan. Från [89], omarbetad med tillstånd.

2.1.5. Laktat

Mjölksyra är en karboxylsyra vars korresponderande bas kallas laktat [24]. Det finns två isomerer av laktat, L-laktat samt D-laktat, men det är endast L-laktat som produceras vid anaerob glykolys [25], [26]. I mänskligt blod dissocierar mer än 99 % av mjölksyran till laktat och protoner. Dissociationen sker kontinuerligt i kroppen och reglerar kroppens pH-balans [1]. Dessutom är laktatet en viktig prekursor till glukoneogenesisen.



Figur 4 – Coricykeln. Från [90], omarbetad med tillstånd.

Vid hög fysisk ansträngning aktiveras den anaeroba glykolysen och musklerna producerar laktat. Musklerna saknar förmågan att producera glukos och därmed transporteras laktatet till levern via blodet. I levern återbildas glukos från laktat via glukoneogenesen. Glukos transporteras sedan tillbaka till blodet för att generera mer energi i form av ATP [13]. Detta kallas Coricykeln och illustreras i Figur 4. Cykeln sker i betydligt större utsträckning vid hög fysisk ansträngning men det produceras även små mängder laktat som cirkuleras vid vila [27].

Protonerna som bildas vid laktatproduktion ackumuleras i musklerna, vilket bidrar till ökad muskeltrötthet. Detta tvingar musklerna till minskad ansträngning som i sin tur leder till ett minskat behov och lägre produktion av ATP. Det resulterar i att laktatproduktionen avtar [1], [11], [28], [29].

Koncentrationen av laktat och protoner i musklerna beror inte bara på hur mycket som produceras utan även på hur mycket som utsöndras till blodet. Coricykeln är därför en viktig process där laktat utsöndras från musklerna, vilket sker i bland annat hjärtat och levern. Dessa processer är så pass effektiva att pH-värdet regleras till cirka 7,4 även under hög fysisk ansträngning [11], [14].

Vid anaerob träning aktiveras transkriptionsfaktorn HIF-1 som ökar kroppens förmåga att utnyttja ATP anaerobt och stimulerar tillväxten av kapillärer. Träning påverkar kroppens biokemiska processer vilket är orsaken till att vältränade och otränade personer har olika halter av laktat under intensiv fysisk ansträngning. En kvantitativ studie som har gjorts visar att en vältränad kvinna genererar nästan dubbelt så mycket ATP per minut per gram muskelmassa genom oxidation av glukos jämfört med en otränad kvinna [11], [14].

2.1.6. Blod

Blodet cirkulerar ständigt genom kroppen och fungerar därmed som en transport för molekyler som utsöndras av olika vävnader [30]. Eftersom blod är en lättåtkomlig vätska, har det använts inom kemisk analys i mer än 70 år och är tillsammans med urin de två mest studerade biologiska materialen inom metabolomik [30]–[32].

Mänskligt blod består av blodplasma och blodkroppar. Blodplasman är den flytande delen av blodet och utgör cirka 55 % av den totala blodvolymen [30], [33], [34]. Resterande 45 % utgörs av vad som kallas den cellulära delen och består till cirka 96 % av röda blodkroppar [30]. Blodplasma består till 90 % av vatten men innehåller metaboliter och många så kallade low molecular compounds såsom glukos, ATP, fettsyror och kolhydrater [34], [35]. Blodplasma kan extraheras från blodprover genom centrifugering och dekantering av supernatanten. Om inget antikoagulerande medel tillsätts till supernatanten kallas den extraherade vätskan för blodserum [30].

Hos människor kan blodvolymen variera beroende på faktorer som vikt, kön och ålder, men en uppskattning är cirka 60 ml per kilogram kroppsvikt. På individnivå varierar blodvolymen väldigt lite men vatten har visats kunna röra sig in och ut ur blodflödet inom några minuter vilket kan upprätthålla en balans i de extracellulära vätskorna [33].

2.2. Metabolomik

Det finns ingen entydig definition på vad metabolomik innebär, men kan sägas vara en identifiering och kvantifiering av varje enskild metabolit under givna förhållanden i ett biologiskt system [6], [31], [36]. Även om en sådan identifiering och kvantifiering idag inte är tekniskt möjlig, kan metabola profiler för olika prover jämföras med varandra [37]. Metabolomets komplexitet och dynamik tillsammans med påverkan av kost försvårar metaboloma analyser [6], [35], [38].

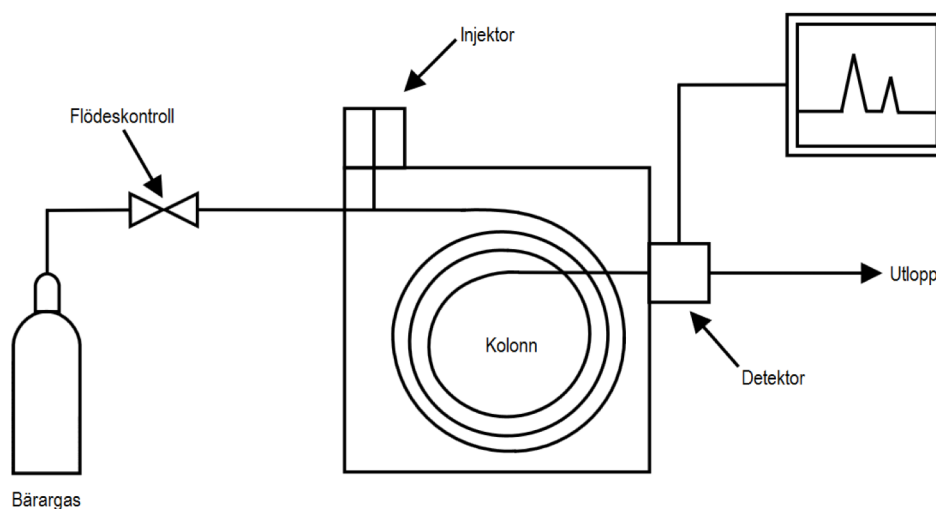
Det finns två tillvägagångssätt inom metabolomik, riktad samt icke-riktad metabolomik. Riktad metabolomik innebär att analysera en förutbestämd grupp metaboliter medan icke-riktad metabolomik innebär att analysera alla provets metaboliter [39]. Den kvantitativa analys som undersöker så många metaboliter som möjligt, eller grupper av metaboliter, kallas metabolic profiling [6], [38].

Flera vetenskapliga publikationer inom ämnet visar att metabolomik är ett användbart verktyg för att undersöka hur metaboliter påverkas av omgivningen [6]. Detta har därmed blivit en standardmetod för att få förståelse för biologiska mekanismer [39]. Metabolomik förutspås även ha stor inverkan inom bland annat bioteknik och näringslära [36].

Uppskattningsvis uppgår antalet metaboliter i det mänskliga metabolomet till cirka 2000, varav flertalet har en stor biologisk betydelse. Detta tal kan givetvis bli mycket större om hänsyn tas till bland annat sekundära metaboliter, det vill säga metaboliter som inte har direkt påverkan på metabolismen [6], [40].

2.3. Gaskromatografi

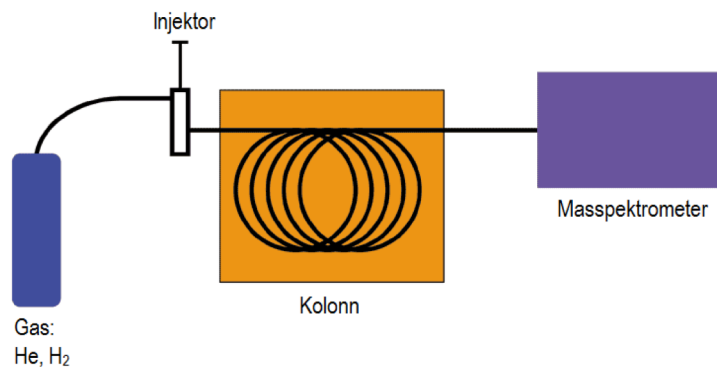
Kromatografi är en metod som separerar komponenter i kemiska blandningar med syfte att undersöka den molekylära sammansättningen [41], [42]. Grunden för kromatografi innebär att olika substanser binder olika hårt till packmaterialet i kromatografikolonnen där separationen sker. Provet injiceras via en injektor, komponenterna separeras sedan i kolonnen och detekteras samt identifieras därefter med hjälp av en detektor [42]. Inom gaskromatografi används en bärargas, ofta helium, vilken transporterar provet från injektorn till detektorn genom kromatografikolonnen [42]. Figur 5 visar ett typiskt kopplingsschema för gaskromatografi.



Figur 5 – Kopplingsschema för gaskromatografi. Från [91], omarbetad med tillstånd.

Transporten över packmaterialet, som även kallas stationärfasen, sker så att provet varken bryts ned eller kondenserar genom att temperaturen i kolonnen hålls precis över kokpunkten för den komponent med högst kokpunkt. På kolonnväggarna finns stationärfasen, som successivt separerar komponenterna [42]. Separationen uppstår eftersom vissa molekyler har starkare affinitet till den stationära fasan jämfört med andra, vilket gör att det tar olika lång tid för molekylerna att nå detektorn [43]. Som stationärfas används ofta icke-polära faser eftersom de är mest stabila [42].

Vanligtvis kopplas gaskromatografikolonnen till joniseringskällan på en masspektrometer, vilket kallas GC-MS [42]. GC-MS är en analysmetod med hög upplösning och känslighet samt god förmåga att separera och identifiera komponenter i kemiska blandningar [39]. Undersökningar gjorda med GC-MS har visats kunna identifiera mer än 300 metaboliter i blodplasma [30]. En illustration på GC-MS kan ses i Figur 6.

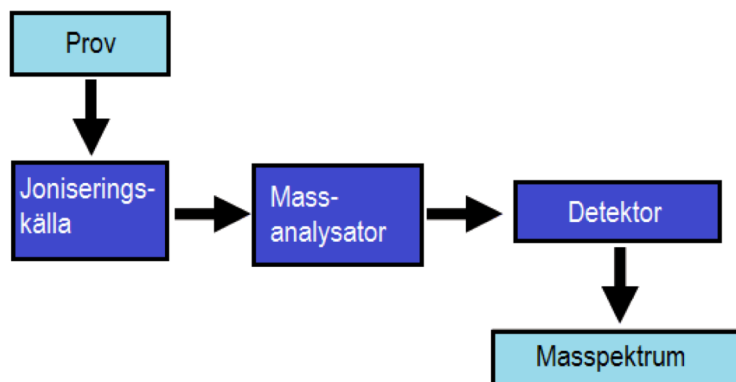


Figur 6 – GC-MS. Från [92], omarbetad med tillstånd.

2.4. Masspektrometri

Masspektrometri är en metod som används för att identifiera kemiska föreningar [44]. Metoden går ut på att jonisera molekyler, separera jonerna genom deras förhållande mellan massa och laddning, m/z , och sedan mäta motsvarande jons m/z och relativa intensitet [42], [44].

En masspektrometer består av tre komponenter: en joniseringskälla, en massanalysator och en jondetektor. Joniseringskällan omvandlar molekyler till en joniserad form. Jonerna accelereras sedan in i massanalysatorn som separerar jonerna med avseende på deras massa och laddning. När jonerna sedan passerar jondetektorn, registreras en elektrisk ström som är möjlig att förstärka och detektera. För att minimera kollisioner mellan joniserade molekyler och andra eventuella kvarvarande ämnen körs masspektrometern under vakuum [45]. Ett typiskt kopplingsschema för en masspektrometer kan ses i Figur 7.



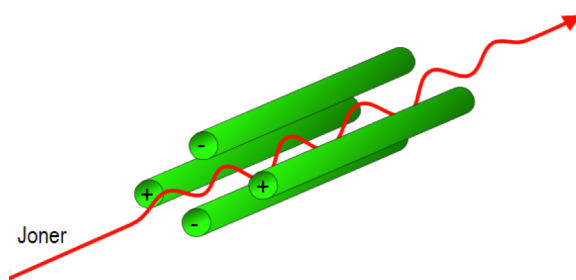
Figur 7 – Kopplingsschema masspektrometri. Från [93], omarbetad med tillstånd.

2.4.1. Jonisering

Jonisering kan ske på olika sätt, exempelvis med hjälp av elektriska fält eller genom bombardering med energirika elektroner, joner eller atomer [44], [45]. Inom GC-MS är electron impact ionization, EI, den vanligaste joniseringsmetoden, vilket innebär att molekyler joniseras när de träffas av elektroner [42], [44]. Joniseringsenergin beror på molekylens i fråga men för organiska föreningar krävs det cirka 8-15 eV [45]. Beroende på elektronernas energi kan dubbelt eller trippelt laddade joner bildas, men inom GC-MS är laddningen nästan alltid enkel [42], [44].

2.4.2. Separation

Efter joniseringen sker en separation i massanalysatorn med hjälp av magnetiska eller elektriska fält. Även fältfria zoner kan användas beroende på jonernas kinetiska energi. Separationen sker under vakuum [42], [44], [45]. Inom GC-MS används vanligtvis quadrupoleanalysatorer, vilka består av fyra parallella stavar som jonerna måste passera mellan [42], [45]. En quadrupoleanalysator illustreras i Figur 8. Jonerna sorteras ut genom påtvingade radiofrekvens- och likströmsfält mellan de diagonalt motsatta stavararna. Genom att variera dessa fält når endast joner med väldigt specifik m/z detektorn [42].

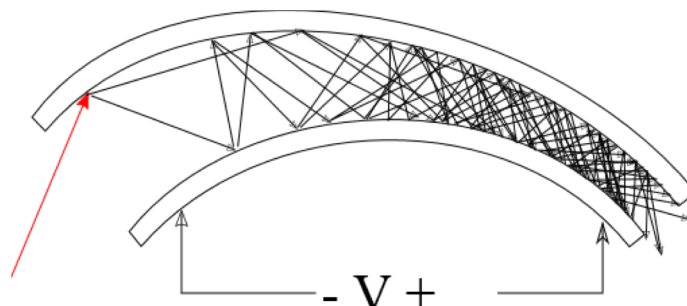


Figur 8 – Quadrupoleanalysator. Från [94], omarbetad med tillstånd.

2.4.3. Detektion

Inom GC-MS sker jondetektionen i de allra flesta fall med en elektronförstärkare. Det finns två typer av elektronförstärkare som kallas diskret respektive kontinuerlig typ. Båda bygger på samma princip och innebär att joner med tillräckligt stor kinetisk energi sänder ut elektroner när de träffar en metall yta [42]. Ju högre hastighet partiklarna har, desto fler elektroner emitteras [44].

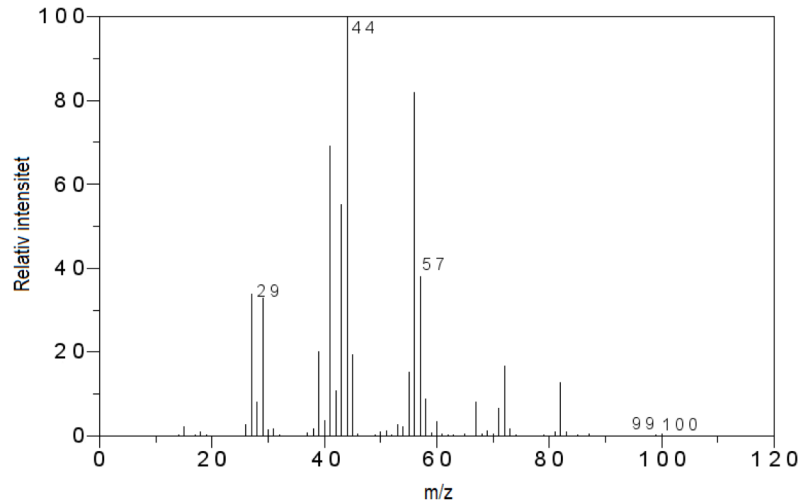
En kontinuerlig elektronförstärkare används ofta tillsammans med quadrupoleanalysatorer och består av en krökt yta med en spänningsgradient. När jonerna träffar ytan, emitteras elektroner som skapar en signalförstärkning [42]. Figur 9 visar en kontinuerlig elektronförstärkare.



Figur 9 – Kontinuerlig elektronförstärkare. Från [95], återgiven med tillstånd.

2.4.4. Masspektrum

Ett masspektrum är en tvådimensionell grafisk representation av identifierade joner i form av signalintensitet på y-axeln och m/z på x-axeln [42], [44]. Detekterade joner registreras i form av en topp med tillhörande signalintensitet och m/z [42]. På grund av masspektrometerns extrema känslighet räcker oftast ett par nanogram av ett prov för att producera ett komplett masspektrum, vilket gör metoden fördelaktig när endast mycket låga mängder prov finns tillgängligt. Eftersom vakuumet i masspektrometern inte är perfekt, kan det hända att ett masspektrum ibland innehåller toppar till följd av kontaminering [42], [45]. Exempel på ett typiskt masspektrum illustreras i Figur 10.



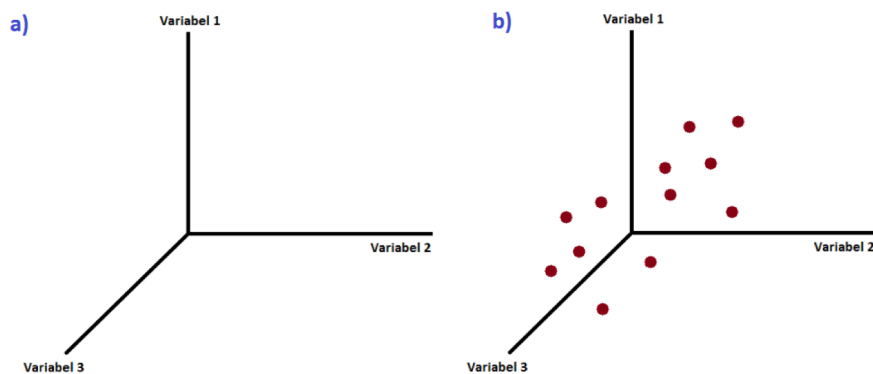
Figur 10 – Exempel på ett masspektrum. Från [96], omarbetad med tillstånd.

2.5. Multivariat dataanalys

Data som samlas inom vetenskapliga undersökningar är i många fall multivariat, vilket innebär att flera variabler mäts i flera olika prov, vid flera olika tidpunkter. På grund av detta innehåller multivariat data väldigt mycket information, vilket kräver speciella metoder vid hantering och analys [46]. Detta sker med hjälp av en så kallad multivariat dataanalys, vilket omfattar de statistiska metoder som samtidigt analyserar flera mätningar på olika objekt [47].

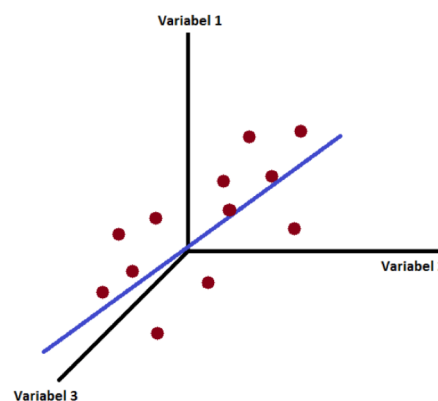
2.5.1. PCA

PCA står för principal component analysis och är en grundläggande metod inom multivariat dataanalys. PCA grundar sig på att från en matris \mathbf{X} med K stycken variabler och N stycken observationer göra en typ av minsta kvadratregression. Detta kan användas för att hitta förhållanden mellan variablerna [46]. En matris \mathbf{X} med K variabler och N observationer ger upphov till ett K -dimensionellt koordinatsystem, se Figur 11a). Genom att lägga till respektive observation till koordinatsystemet erhålls ett moln av mätpunkter, se Figur 11b).



Figur 11 – a) Tre stycken variabler ger upphov till ett tredimensionellt koordinatsystem.
 b) Observationer i ett tredimensionellt koordinatsystem. Från [46], omarbetad med tillstånd.

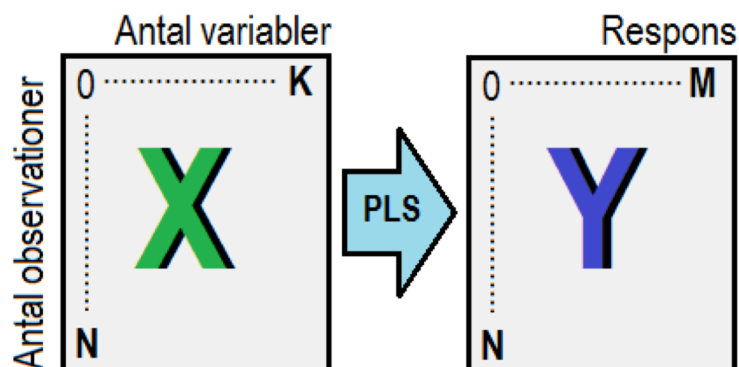
Därefter kan en så kallad huvudkomponent beräknas. Den första komponenten är en linje och beräknas enligt minsta kvadratmetoden, se Figur 12. En enda komponent beskriver oftast inte datavariationen tillräckligt bra, vilket medför att en andra komponent ofta beräknas. Även den andra komponenten är en linje som är ortogonal mot den första komponenten. De två första komponenterna utgör tillsammans ett plan som observationerna kan projiceras på, vilket sedan kan visualiseras. Fler än två komponenter kan även användas för att ytterligare beskriva datan med villkoret att komponenterna ska vara ortogonala mot varandra [46].



Figur 12 – Den första PCA-komponenten.
 Från [46], omarbetad med tillstånd.

2.5.2. PLS

Projections to latent structures by means of partial least squares, även kallad PLS, är en generalisering av PCA som används för att sammanlänka information mellan två datamatriser X och Y . Syftet med PLS är att kunna förutsäga värden i matrisen Y med hjälp av matrisen X , vilket görs genom att skapa en linjär multivariat modell [46], [48]. Detta illustreras i Figur 13.



Figur 13 – Generell PLS-analys med en $N \times K$ X -matris och en $N \times M$ Y -matris.
 Från [46], omarbetad med tillstånd.

En första PLS-komponent kan, i form av en linje, beräknas som ett sätt att approximera molnet av mätpunkter i X-rummet. Genom att projicera samtliga observationer på linjen, får varje observation en endimensionell koordinat som kallas score. Alla dessa score-värden utgör tillsammans en vektor som kan betecknas \mathbf{t}_1 . Denna vektor, multiplicerat med en skalär, c_1 , används för att uppskatta matrisen \mathbf{Y} som:

$$\hat{\mathbf{Y}}_1 = c_1 \mathbf{t}_1 \quad (1)$$

Differensen mellan \mathbf{Y} och $\hat{\mathbf{Y}}_1$ kallas residual och är ett mått på modellens kvalitet. Den första residualen kan då beräknas som:

$$\mathbf{R}_1 = \mathbf{Y} - \hat{\mathbf{Y}}_1 \quad (2)$$

Eftersom det oftast krävs mer än en komponent för att tillräckligt kunna beskriva datan, kan en andra komponent användas för att expandera modellen. Likt PCA är den andra komponenten en linje ortogonal mot den första komponenten. Genom att på nytt projicera observationerna på den andra komponenten fås en ny vektor \mathbf{t}_2 och en ny vikt c_2 . \mathbf{Y} kan då uppskattas på nytt som en linjärkombination av vektorerna enligt:

$$\hat{\mathbf{Y}}_2 = c_1 \mathbf{t}_1 + c_2 \mathbf{t}_2 \quad (3)$$

där en ny, mindre residual kan beräknas enligt:

$$\mathbf{R}_2 = \mathbf{Y} - \hat{\mathbf{Y}}_2 \quad (4)$$

På så sätt kan fler komponenter successivt läggas till som ett sätt uppskatta matrisen \mathbf{Y} [46].

2.5.3. Korrelation och kausalitet

Det är viktigt att skilja på begreppen korrelation och kausalitet. Två variabler är positivt korrelerade om värdet för den ena variabeln ökar när värdet för den andra variabeln ökar. Två variabler kan också vara negativt korrelerade i den mening att när värdet för den ena variabeln ökar, minskar värdet för den andra variabeln eller tvärtom. En korrelation betyder dock inte att det finns en direkt koppling mellan variablerna, utan kan bero på att okända faktorer ger upphov till korrelationen. Kausalitet innebär däremot att en förändring i en variabel direkt orsakar en förändring i en annan variabel [46], [49].

3. Metod

Metoden delades upp i tre praktiska moment: etikprövning, provtagning samt analys av prover.

3.1. Etikprövning

Inför genomförandet av provtagning och experimentell analys krävdes en etikprövning. Detta utfärdades då provtagningen involverade mänsklig vävnad, vilket måste behandlas enligt ett antal restriktioner och regler. Enligt svensk lag krävs samtycke från försökspersoner vars vävnad ämnas att användas i forskningssyfte. Ett kontrakt rörande samtycke upprättades därför mellan forskningshuvudman och försökspersoner. Ansökan om etikprövning skickades in av projekthandledaren till Göteborgs Etikprövningsnämnd, ansökan återfinns i Bilaga 1. Det upprättade kontraktet kan ses i Bilaga 2.

3.2. Provtagning

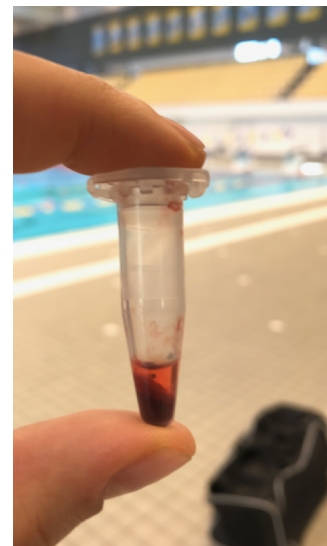
Provtagningarna utfördes vid två separata tillfällen. Det första tillfället var en testomgång med syfte att undersöka huruvida provtagning var genomförbar. Dessa prov analyserades inte. Det andra tillfället var den ordinarie provtagningen, vars resultat rapporten baseras på. Samtliga prov togs på simmare som hade ätit innan provtagning, så kallade non fasting samples.

3.2.1. Provtagning – testomgång

Testomgången utfördes på Valhallabadet i Göteborg med tre försökspersoner, vilka utsattes för fysisk ansträngning genom simning på en högintensiv nivå. Provtagning utfördes enligt Steg 1 i Bilaga 3 och placerades därefter på kolsyreis. Totalt togs fem prov per försöksperson. Det första provet togs innan fysisk ansträngning, tre prover togs sedan med intervaller om fem minuter under fysisk ansträngning och slutligen togs ett sista prov efter cirka en timmes vila.

3.2.2. Provtagning – Nationellt ElitCentra

Ordinarie provtagning utfördes på NEC, Nationellt ElitCentra, i Stockholm där majoriteten av svenska simlandslaget tränar. Fyra simmare ställde frivilligt upp och i enlighet med Etikprövningsnämndens stadgar slöts ett avtal mellan respektive försöksperson och forskningshuvudman. Provtagningar gjordes under två träningstillfällen. Vid första träningstillfället togs prover både före och efter träning enligt Bilaga 3, bortsett från Steg 2. Provtagningen utfördes alltså inte under fysisk ansträngning och dessa prov analyserades heller inte. Vid det andra träningstillfället utsattes försökspersonerna för fysisk ansträngning, där de simmade korta tävlingsdistanser, 100-200 m, på en högintensiv nivå. Provtagning utfördes enligt Bilaga 3 och totalt fyra prover togs för varje simmare. Det första provet togs före träning, det andra och tredje under träningens gång samt det fjärde efter aktiv återhämtning. Totalt togs 16 prover, fyra per simmare. Samtliga prover förvarades på is i åtta timmar, varefter de frystes ned till -18°C . Ett av de centrifugerade blodproven kan ses i Figur 14.



Figur 14 – Centrifugerat blodprov. Författarens egen bild.

3.3. Analys

Samtliga 16 prover analyserades i slumpmässig ordning med GC-MS. Specifikationer återfinns i Bilaga 4. Rådatan erhöles som en Excel-fil med normaliserade signalintensiteter för totalt 90 stycken identifierade metaboliter i var och en av de fyra prov som togs per simmare. Samtliga laktatvärden lades sedan till vilket resulterade i en 4x91 matris per simmare, se Figur 15.

	Laktat	Metabolit 1	Metabolit 90
Prov 1				
Prov 2				
Prov 3				
Prov 4				

Figur 15 – Illustration av datamatrix som erhöles för varje simmare.

Varje simmares datamatrix analyserades i programmet SIMCA. Huvudsyftet med dataanalysen var att undersöka huruvida laktatkoncentrationer kan förutsägas med hjälp av uppmätta metabolitintensiteter. Detta gjordes genom en PLS, i vilken en linjär modell av laktatkoncentrationen beräknas utifrån samtliga metabolitintensiteter. Därför delades var och en av de fyra 4x91 matriserna upp i en **X**- och en **Y**-matrix, se Figur 16.

	Laktat	Metabolit 1	Metabolit 90
Prov 1	Y			
Prov 2				
Prov 3				
Prov 4				

Figur 16 – Visualisering av en datamatrix uppdelad i en 4x1 **Y**-matrix samt en 4x90 **X**-matrix.

För att få en snabb överblick över metaboliterna i **X**-matrixerna gjordes först en PCA för varje matrix. Därefter genomfördes en PLS-analys per datamatrix. Varje PLS genererade en loading plot och en coefficient plot, vilka användes för att tolka datan. Hur mycket varje metabolit bidrar till den linjära modellen visualiseras i en coefficient plot. En metabolit med stor koefficient, positiv eller negativ, bidrar mer till modellen jämfört med en metabolit med liten koefficient. Eftersom fyra PLS-analyser gjordes, erhöles varje metabolit fyra stycken koefficienter.

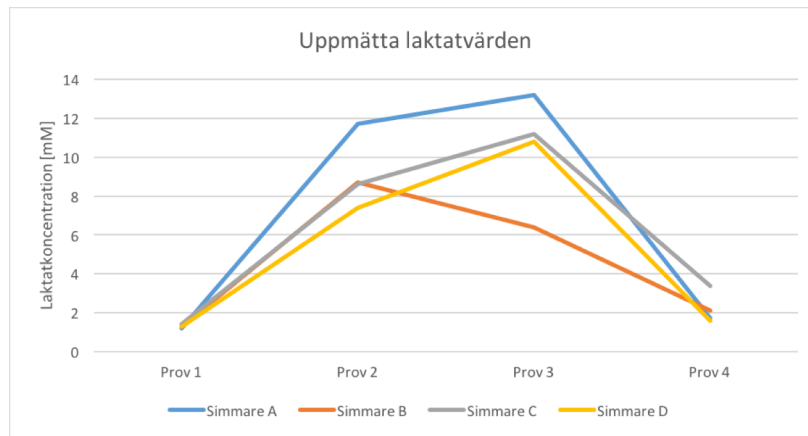
På grund av den stora datamängden krävdes en avgränsning i antalet metaboliter. Avgränsningen bestod i att välja vilka gemensamma metaboliter som hos alla fyra simmare bidrog mest till den linjära modellen. Detta gjordes genom att summera de fyra koefficienterna för varje metabolit. Om absolutbeloppet av koefficientsumman underskred 0,07 exkluderades metaboliten från alla fyra **X**-matrixer. Avgränsningen resulterade i 28 signifikanta metaboliter. Till dessa 28 inkluderades även noradrenalin och α -ketoglutarat på grund av att de båda spelar en central roll i metabola processer under fysisk ansträngning. Totalt avgränsades alltså datan till 30 metaboliter som kan anses vara signifikanta. Signifikans-nivån på 0,07 valdes godtyckligt.

För att få en tydligare bild över den avgränsade datan gjordes en simpel korrelationsanalys för varje reducerad datamatrix i Excel, med syftet att undersöka hur de 30 metabolitvärdena individuellt korrelerade med uppmätta laktatvärden. Korrelationsvärdena sammanställdes sedan i en tabell. Efter korrelationsanalysen gjordes sedan fyra nya PLS-analyser, en för varje reducerad datamatrix.

4. Resultat

4.1. Laktatkoncentrationer

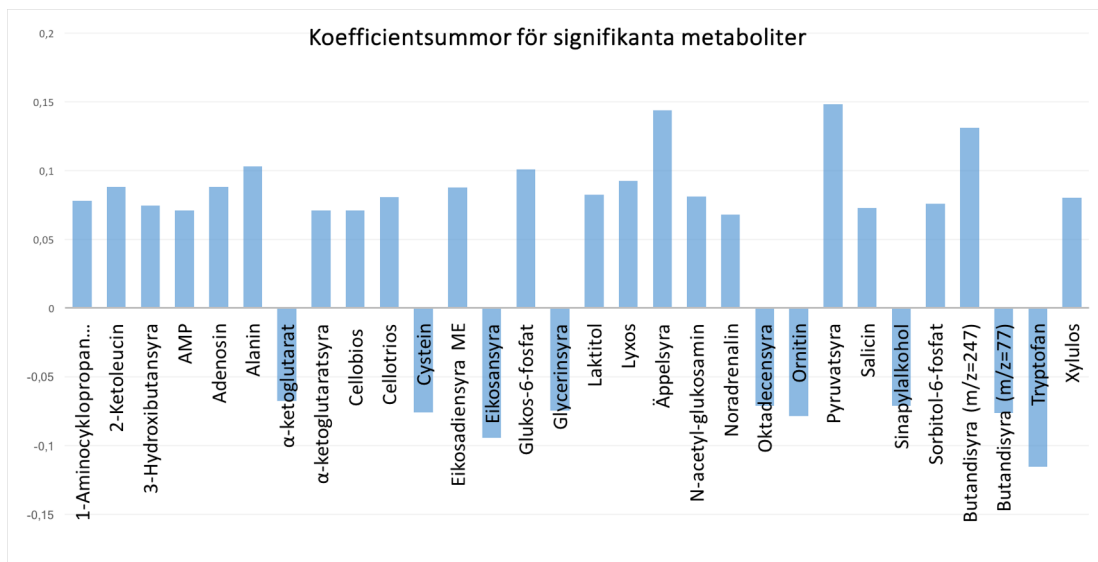
Uppmätta laktatkoncentrationer illustreras i Figur 17. Bortsett från simmare B ökar laktatkoncentrationen under träningspasset, vilket motsvarar prov 2 och prov 3. För samtliga simmare gäller även att det första och sista laktatvärdet är nästintill identiska, vilket är förväntat då båda proverna togs vid vila.



Figur 17 – Uppmätta laktatvärden för respektive simmare under fysisk ansträngning.

4.2. PLS för samtliga metaboliter

Loading plot och coefficient plot för de fyra första PLS-analyserna återfinns i Bilaga 5. Signifikansanalysen gjordes genom att summera metaboliternas fyra koefficienter och exkludera alla metaboliter vars absolutbelopp av koefficientsumman understeg 0,07 med undantag för noradrenalin och α -ketoglutarat. Koefficientsummorna för de 30 metaboliterna illustreras i Figur 18. En kort sammanställning av metaboliternas egenskaper återfinns i Bilaga 6. Samtliga koefficienter och koefficientsummer återfinns i Bilaga 7.



Figur 18 – Koefficientsummer för de 30 metaboliterna.

Det bör noteras att butandisyra finns på två ställen i Figur 18, med två olika m/z-värden. Orsaken är att metaboliten troligtvis joniserats och fragmenterats på olika sätt i masspektrometern, vilket resulterar i olika m/z-värde.

4.3. Korrelationsmatris

Matrisen från korrelationsanalysen som gjordes i Excel återfinns i Tabell 1. Korrelationsvärdena i tabellen varierar mellan -1 och 1, där ett positivt värde indikerar en positiv korrelation medan ett negativt värde motsvarar en negativ korrelation. Värden nära noll innebär att metabolit och laktat är svagt korrelerade.

Tabell 1 – Korrelationsmatris med tillhörande värden för samtliga signifikanta metaboliter i jämförelse med respektive laktatkoncentration för varje simmare.

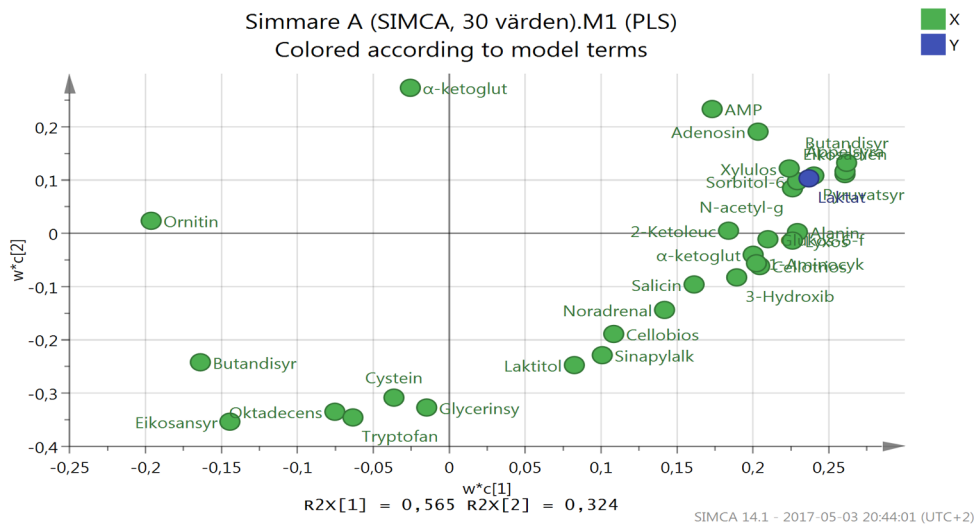
Metaboliter	Simmare A	Simmare B	Simmare C	Simmare D
<i>1-aminocyklopropan-karboxylsyra</i>	0,760019	0,778051	0,464868	0,663559
<i>2-ketoleucin</i>	0,691144	0,835916	0,503865	0,733301
<i>3-hydroxibutansyra</i>	0,711444	0,166889	0,726217	0,258992
<i>AMP</i>	0,648792	0,897888	0,147171	0,248743
<i>Adenosin</i>	0,764405	0,664384	0,001451	0,738074
<i>Alanin</i>	0,86104	0,826715	0,699132	0,517533
<i>α-ketoglutarat</i>	-0,09446	-0,408804	-0,874119	-0,870371
<i>α-ketoglutaratsyra</i>	0,752964	-0,43826	0,702755	0,677056
<i>Cellobios</i>	0,745118	0,848703	0,187488	0,705331
<i>Celotrios</i>	0,766344	0,979871	0,197377	0,700743
<i>Cystein</i>	-0,1355	-0,6746	-0,34375	-0,23673
<i>Eikosadiensyra-metylester</i>	0,977709	0,703098	0,446162	0,536628
<i>Eikosansyra</i>	-0,54122	-0,8005	-0,30855	0,069811
<i>Glukos-6-fosfat</i>	0,788094	0,860431	0,491197	0,983886
<i>Glycerinsyra</i>	-0,05448	0,35756	-0,60966	-0,67021
<i>Laktitol</i>	0,310801	0,971011	0,446351	0,821497
<i>Lyxos</i>	0,848267	0,61067	0,521596	0,79777
<i>Äppelsyra</i>	0,976928	0,975204	0,865118	0,967678
<i>N-acetyl-glukosamin</i>	0,849619	0,681416	0,257046	0,791274
<i>Noradrenalin</i>	0,533433	0,955152	0,213594	0,670938
<i>Oktadecensyra</i>	-0,28423	-0,18661	-0,22663	-0,60543
<i>Ornitin</i>	-0,73814	0,526449	-0,7855	-0,63271
<i>Pyruvatsyra</i>	0,902549	0,785538	0,945527	0,934007
<i>Salicin</i>	0,603464	0,383295	0,514023	0,836379
<i>Sinapylalkohol</i>	0,380168	-0,779483	-0,617926	-0,449030
<i>Sorbitol-6-fosfat</i>	0,859883	0,818769	0,025455	0,822583
<i>Butandisyra (m/z=247)</i>	0,981737	0,913234	0,629905	0,766713
<i>Butandisyra (m/z=77)</i>	-0,61439	-0,21134	-0,21715	-0,7147
<i>Tryptofan</i>	-0,23938	-0,7193	-0,79153	-0,50407
<i>Xylulos</i>	0,841641	0,857699	-0,02655	0,711166

Som kan ses i Tabell 1 finns en stor variation mellan alla fyra simmare, men tre metaboliter som hos alla fyra simmare individuellt korrelerar starkt positivt med laktat är äppelsyra, pyruvatsyra och alanin.

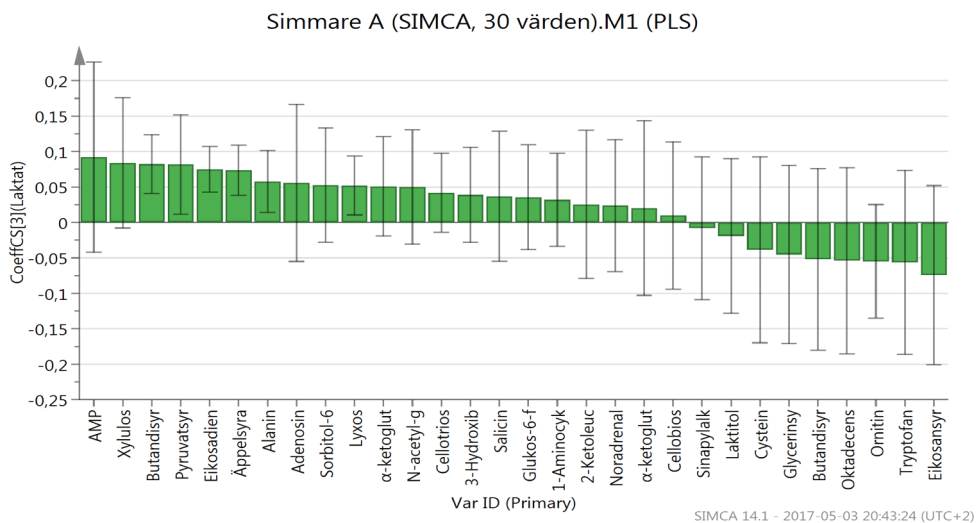
Det är viktigt att poängtera att korrelationsvärdena i Tabell 1 inte är identiska med koefficienterna från PLS-analyserna. Detta har att göra med att korrelationsanalysen i Excel endast jämför varje enskild signifikant metabolit mot laktatet, medan en PLS-analys skapar en linjär modell utifrån alla metaboliter tillsammans.

4.4. PLS för signifikanta metaboliter

Loading plot och coefficient plot för PLS-analyserna på de signifikanta metaboliterna illustreras i Figur 19-26. Detaljer kring PLS-analyserna återfinns i Bilaga 8. I en coefficient plot indikerar en stor koefficient att metaboliten bidrar mycket till den linjära modellen medan en liten koefficient knappt bidrar alls. Metaboliternas påverkan på laktatkoncentrationen kan även visualiseras i en loading plot. De metaboliter som är positionerade nära laktat eller på motsatt diagonal sida har stor påverkan.

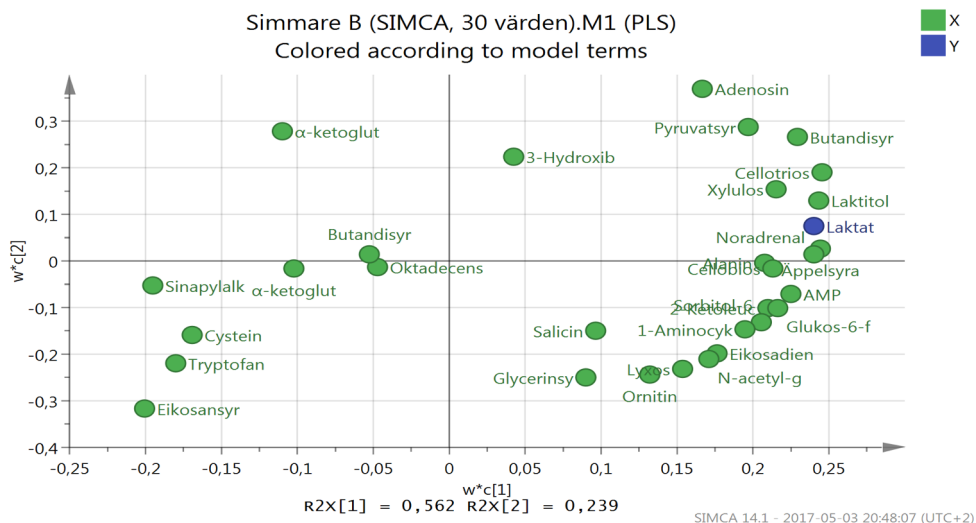


Figur 19 – Loading plot för simmare A.

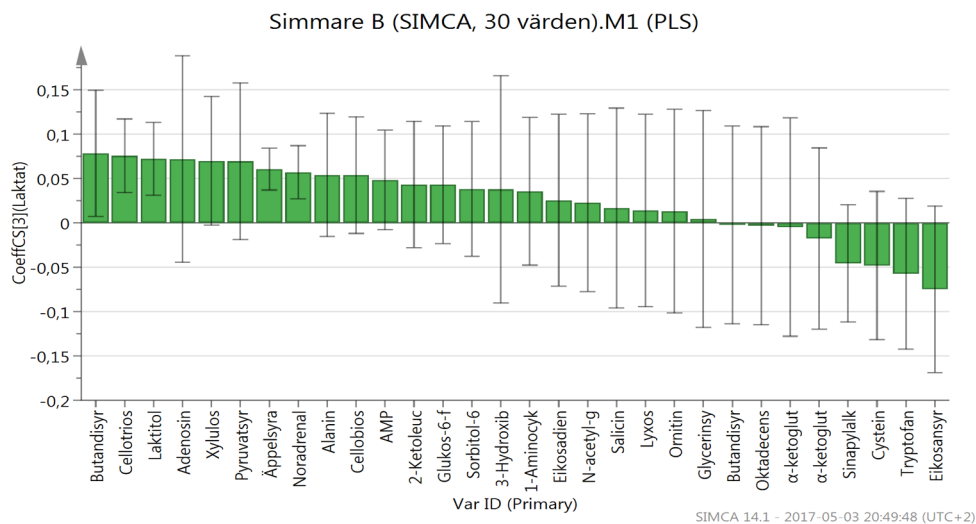


Figur 20 – Coefficient plot för simmare A.

Figur 19 och 20 sammanställer PLS-analysen för simmare A. Pyruvatsyra, xylulos och butandisyran är några av de metaboliter som i Figur 19 ligger närmast laktat och är därför de metaboliter som påverkar laktatet mest. Den andra butandisyran som är positionerad på diagonalt motsatt sida har även den en stor påverkan. Liknande information fås ur Figur 20, som även visar att AMP och eikosansyra påverkar laktatet.

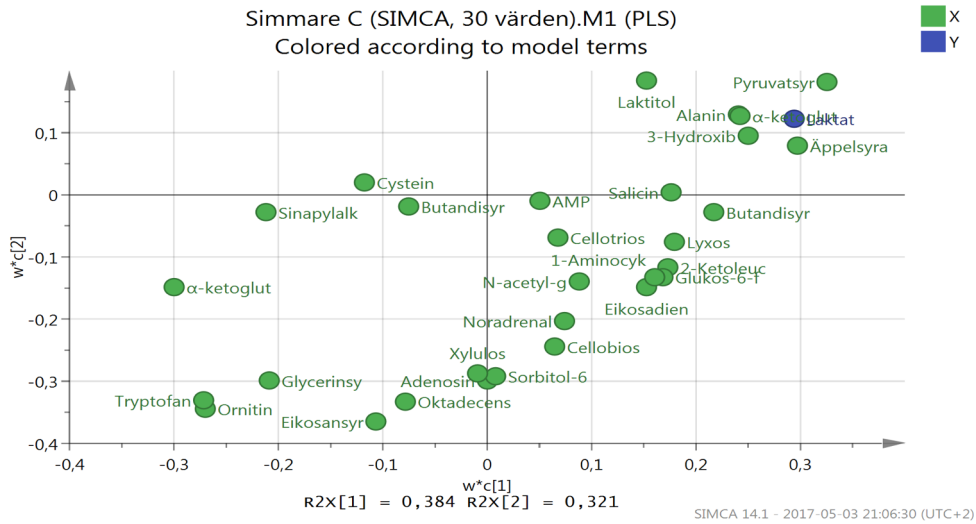


Figur 21 – Loading plot för simmare B.

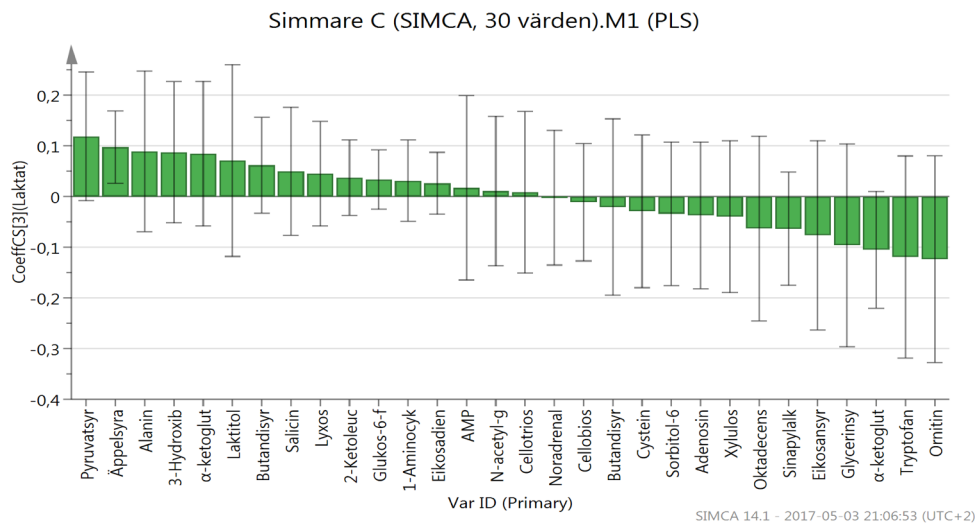


Figur 22 – Coefficient plot för simmare B.

Figur 21 och 22 sammanställer PLS-analysen för simmare B. Noradrenalin, laktitol och äppelsyra är några av de metaboliter som i Figur 21 ligger närmast laktat och är därför de metaboliter som påverkar laktatet mest. På den diagonalt motsatta sidan återfinns cystein och sinapylalkohol, vilka också påverkar laktatet. Liknande information fås ur Figur 22, som även visar att butandisyra och eikosansyra har stor påverkan.

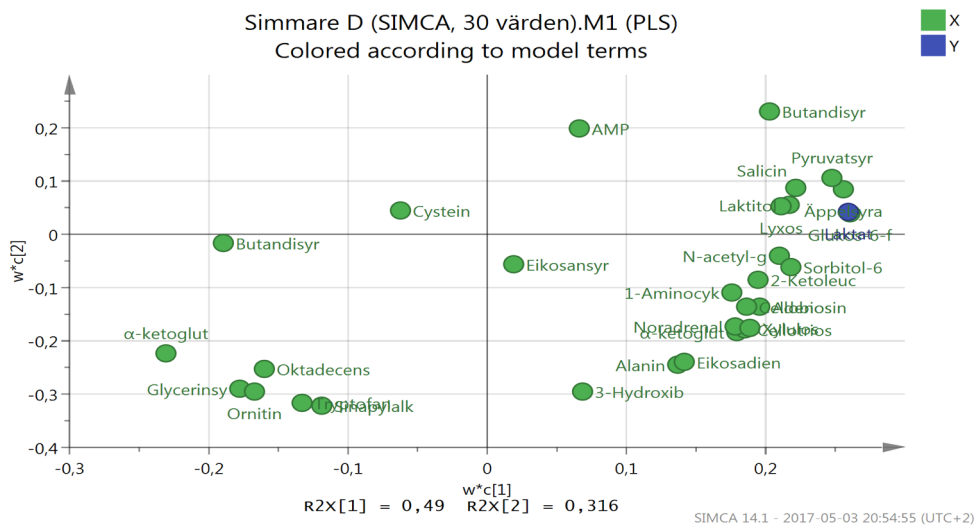


Figur 23 – Loading plot för simmare C.

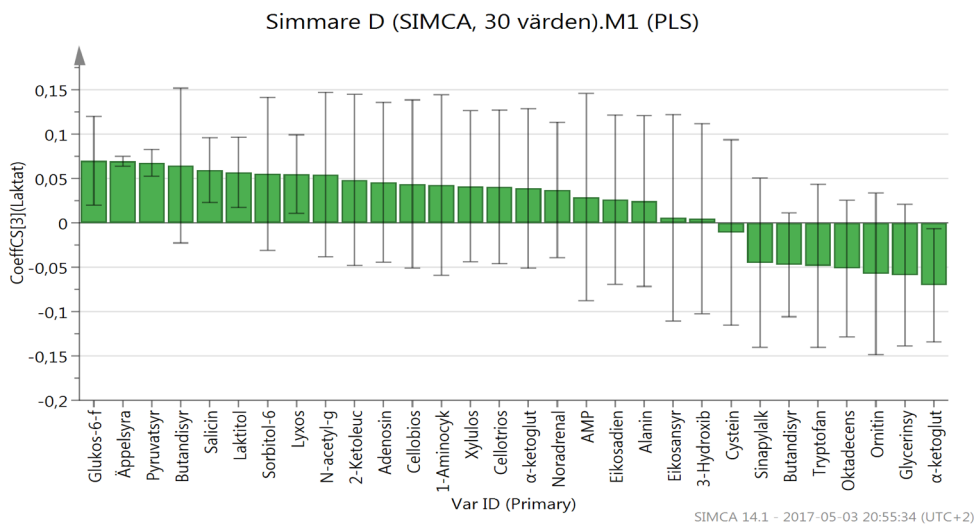


Figur 24 – Coefficient plot för simmare C.

Figur 23 och 24 sammanställer PLS-analysen för simmare C. Äppelsyra, α -ketoglutaratsyra och 3-hydroxibutansyra är några av de metaboliter som i Figur 23 ligger närmast laktat och är därför de metaboliter som påverkar laktatet mest. På den diagonalt motsatta sidan återfinns α -ketoglutarat, vilket också påverkar laktatet. Liknande information fås ur Figur 24, som även visar att pyruvatsyra och ornitin har stor påverkan.



Figur 25 – Loading plot för simmare D.



Figur 26 – Coefficient plot för simmare D.

Figur 25 och 26 sammanställer PLS-analysen för simmare D. Äppelsyra, pyruvatsyra och salicin är några av de metaboliter som i Figur 25 ligger närmast laktat och är därför de metaboliter som påverkar laktatet mest. På den diagonalt motsatta sidan återfinns butandisyra, vilket också påverkar laktatet. Liknande information fås ur Figur 26, som även visar att glukos-6-fosfat och α -ketoglutarat har stor påverkan.

5. Diskussion

5.1. Analys av resultat

Från resultatet kan ett antal korrelationer mellan laktat och metaboliter tydligt observeras och utav de 30 signifikanta metaboliterna är de metaboliter med störst koefficient mest intressanta. Dock skiljer sig korrelationskoefficienterna åt mellan simmarna, vilket kan bero på en mängd olika faktorer såsom skillnader i metabolism, kosthållning och omsättning av laktat. Troligtvis är varken för mycket eller för lite laktat bra för prestationsförmågan vid anaerob träning. En låg laktatproduktion via den anaeroba glykolysen kan betyda att det inte finns tillräckligt med glukos. Låga laktatvärden innebär även att glukoneogenesen tvingas producera glukos från andra prekursorer såsom alanin, vilket skulle kunna påverka prestationsförmågan negativt. En hög laktatproduktion å andra sidan, medför en ökad ackumulation i musklerna, vilket troligtvis orsakar försurning och kan försämra prestationsförmågan. Sannolikt existerar en optimal laktatomsättning som minimerar tröttheten och samtidigt genererar maximalt med energi. Elitidrottare antas ha en effektiv metabolism, vilket gör det önskvärt att nå en optimal laktatomsättning. Under hög fysisk ansträngning åtgår mycket energi och kroppen behöver rätt typ av kost för att prestera optimalt. Genom att anpassa en kosthållning utifrån de metaboliter som hos alla fyra simmare påvisats ha en korrelation med laktat, kan prestationsförmågan möjligtvis förbättras. Denna slutsats gäller troligen för alla idrottare. Samtliga signifikanta korrelationer redovisas tydligt i Figur 19-26.

En av de metaboliter som hos alla fyra simmare påvisade en stark positiv korrelation med laktat var äppelsyra. Metaboliten är inte bara involverad i citronsyracykeln utan har även många andra positiva effekter vid fysisk ansträngning. Dessutom har dess korresponderande bas förmågan att påskynda laktatomsättningen samt öka glukoskoncentrationen i blodet. Detta tyder på att glukoneogenesen påskyndas, vilket troligtvis medför en prestationsförbättring. Metaboliten har även en viktig funktion vad gäller transport av NADH till mitokondrierna och påskyndar på så vis elektrontransportkedjan, vilket också bidrar till att mer energi genereras. Korrelationen mellan äppelsyra och laktat kan delvis bero på att båda metaboliterna har betydande funktioner vid fysisk ansträngning. Det är även möjligt att det finns en kausalitet eftersom att den joniserade formen av äppelsyra är involverad i laktatmetabolismen genom att effektivisera laktatomsättningen.

En annan metabolit som korrelerade starkt med laktat var pyruvatsyra. Eftersom pyruvatsyra kan dissociera till pyruvat som direkt kan omvandlas till laktat i anaeroba glykolysen förväntades en stark korrelation, vilket bekräftades av analysen. Pyruvat är även involverad i andra metabola processer, såsom citronsyracykeln och glukoneogenesen. Det är därmed svårt att uppskatta hur stor andel av pyruvatet som faktiskt bildar laktat. På grund av detta är det svårt att avgöra hur pyruvat som kosttillskott kan påverka laktatomsättningen. Alanin korrelerar, liksom äppelsyra och pyruvatsyra, starkt med laktat. Den positiva korrelationen kan troligtvis förklaras genom att både alanin och laktat är prekursorer till glukoneogenesen och har därmed liknande funktion vid anaerob träning.

Tryptofan var en av de metaboliter som uppvisade en stark negativ korrelation med laktat. Höga nivåer av tryptofan ökar serotoninproduktionen vilket inducerar trötthet. Det finns inga belegg för att reducerade serotoninivåer kan förbättra prestationsförmågan, men att nivåerna av tryptofan sjunker då laktatnivåerna ökar är en indikation på att serotoninets trötthetsverkan motverkas vid fysisk ansträngning. Även ornitin var en av de metaboliter som hade en stark negativ korrelation med laktat. Studier visar att ornitin motverkar trötthet, vilket förklaras genom att energiomsättningen blir mer effektiv när ammoniak avlägsnas.

En förklaring till den negativa korrelationen kan vara att laktat som en biomarkör för trötthet inducerar en förbrukning av ornitin under fysisk ansträngning, vilket innebär att laktathalten är hög medan ornitinhalten är låg. Vidare korrelerade både α -ketoglutaratsyra och dess korresponderande bas, α -ketoglutarat, med laktat. Enligt tabellen i Bilaga 7 har de två metabolitkoefficientsummorna olika tecken, vilket är rimligt eftersom α -ketoglutaratsyra deprotoneras till α -ketoglutarat. Det borde innebära att när baskoncentrationen är hög är syrakoncentrationen låg. Ett flertal andra signifikanta metaboliter visade både positiva och negativa korrelationer med laktat vilket både kan bero på individuella variationer hos simmarna samt felkällor. Detta gör det svårt att dra slutsatser kring deras påverkan på laktatmetabolismen. Dock kan dessa ha betydelsefulla funktioner vid fysisk ansträngning men det krävs mer forskning för att påvisa detta.

Utifrån resultatet är det möjligt att laktat är en biomarkör för trötthet genom att indirekt reglera metabolithalter som påverkar prestationen under fysisk ansträngning. Många av de metaboliter som i resultatet uppvisade en korrelation med laktat finns dessutom som kosttillskott i dagsläget och har en positiv effekt på prestationsförmågan. Detta stärker trovärdigheten av resultatet. Kroppens metabolism är dock mycket komplex och styrs av många faktorer, vilket gör det svårt att avgöra laktatets exakta roll.

5.2. Felkällor och förbättringar

En av de största felkällorna i undersökningen är att blodprover togs ifrån kapillärer i öronsnibbarna och inte direkt från musklerna. Detta är ett problem eftersom det inte alls är säkert att kapillärblodvärden från öronsnibbarna är identiska med blodet kring musklerna. Eftersom slaggprodukter transporteras bort från musklerna via blodet, samt att blodet cirkulerar snabbare under fysisk ansträngning kan det dock hända att kapillärblodvärden efterliknar muskelvärden.

En av de större svårigheterna med undersökningen var hanteringen av proverna. Avsikten var att direkt efter provtagningen frysa ned blodserumet med hjälp av kolsyreis. Anledningen till nedfrysningen av proverna var att försöka hålla den kemiska sammansättningen konstant genom att stagnera eventuella kemiska reaktioner. Eftersom all kolsyreis sublimerade innan provtagningen påbörjades, användes vanlig is som substitut. Det gick uppskattningsvis 20 minuter från provtagning tills proverna placerades på is och inte förrän efter åtta timmar placerades proverna i -18°C . Det är med andra ord möjligt att blodprovernas kemiska sammansättning kan ha förändrats. Dock har alla prov behandlats under samma förhållanden, vilket medför att proverna borde ha påverkats på liknande sätt.

Det var även svårt att urskilja huruvida metabolitintensiteterna varierade på grund av fysiologiska orsaker eller på grund av instrumentell variation. GC-MS-analysen som gjordes är optimal för blodprover där försökspersonerna inte har ätit innan, så kallade fasting samples. Simmarna i undersökningen hade ätit innan, vilket medför att proverna som togs var non fasting samples. Det går därför inte att säkerställa att GC-MS-analysen genererade helt tillförlitliga resultat.

Genom att minimera felkällorna är det möjligt att förbättra resultatet. En av dessa förbättringar innebär att öka antalet prover per simmare samt att repetera provtagningarna. Detta i syfte att erhålla mer data för den statistiska analysen. Det är även viktigt att proverna fryses ned så snabbt som möjligt till en temperatur som håller den kemiska sammansättningen intakt, exempelvis med kolsyreis. Dessutom är det önskvärt att använda fasting samples då detta är optimalt för den GC-MS-analys som utfördes.

6. Slutsatser

Från resultatet kan fastställas att korrelationer mellan laktat och ett antal metaboliter existerar. Däremot är det svårt att avgöra om de signifikanta metaboliterna är direkt involverade i laktatmetabolismen, på grund av dess komplexa dynamik. Det kommer krävas ytterligare undersökningar och mer avancerade metoder för att avgöra huruvida det finns en kausalitet, men de signifikanta korrelationerna skulle eventuellt kunna ligga till grund för framtida forskning inom prestationsoptimering.

7. Projektets framtid

Denna studie är som tidigare nämnts ingen fortsättning på något tidigare kandidatarbete, utan har byggts upp från grunden. Projektet har utvecklat en metodik för att hitta korrelationer mellan laktat och andra metaboliter, men laktatmetabolismen är uppenbarligen ett väldigt komplext område vilket försvårar kvalitativa analyser. Det är en stor utmaning att kartlägga alla biologiska system i kroppen och nya upptäckter sker ständigt inom området.

Framtiden ser dock ljus ut och analysmetoder såsom NMR och GC-HRMS har på senare tid visats fördelaktiga för studier inom metabolomik, vilket är av intresse för utvecklingen av denna undersökning. En kombination av flera olika mätmetoder, tillsammans med ett reglerat kostupplägg hos idrottarna kan ge en mycket tydlig bild över vilka metaboliter som spelar roll för laktatmetabolismen. Förutsättningarna för att utveckla detta område kräver samarbeten mellan bland annat universitet, biotekniker, dietister, fysiologer, läkare och specialförbund såsom riksidrottsförbundet och NEC.

Referenser

- [1] L. B. Gladden, "Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium," *J. Physiol.*, vol. 558, no. Pt 1, ss. 5–30, 2004.
- [2] J. J. Todd, "Lactate: Valuable for physical performance and maintenance of brain function during exercise," *Biosci. Horizons*, vol. 7, ss. 1–7, 2014.
- [3] "20 bästa genom tiderna," *Svenska simförbundet*. [Online]. Tillgänglig: <http://www.svensksimidrott.se/Varagrenar/Simning/Simstatistik/20bastagenomtiderna>. [Hämtad: 26-Apr-2017].
- [4] B. Alberts, *Molecular biology of the cell*, Sixth. Garland Science, 2015.
- [5] "Metabolit," *Uppslagsverk - NE*. 2017.
- [6] K. Dettmer, P. A. Aronov, and B. D. Hammock, "Mass Spectrometry-Based Metabolomics," *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 47, no. 12, ss. 987–992, 2009.
- [7] D. P. Clark and N. J. Pazdernik, *Biotechnology*, Second. Kidlington: Elsevier Inc., 2016.
- [8] J. M. (Jeremy M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, "The citric acid cycle," in *Biochemistry*, Fifth., Palgrave Macmillan, 2002.
- [9] B. Borgström, "Citronsyracykeln," *Uppslagsverk - NE*. 2017.
- [10] S. Nordlund and L. Ernster, "Bioenergetik," *Uppslagsverk - NE*. 2017.
- [11] E. Newsholme and T. Leech, *Functional Biochemistry in health and disease*, 1st editio., vol. 53, no. 9. Wiley-Blackwell, 2010.
- [12] G. N. Cohen, "Glycolysis, Gluconeogenesis and Glycogen Synthesis," in *Microbial Biochemistry*, Third., Dordrecht: Springer Netherlands, 2014, ss. 73–81.
- [13] A. T. da Poian and M. A. R. B. Castanho, *Integrative Human Biochemistry*, First. New York, NY: Springer New York, 2015.
- [14] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, and L. Stryer, *Biochemistry*, Eighth. WH Freeman, 2015.
- [15] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, "Gluconeogenesis and Glycolysis Are Reciprocally Regulated," in *Biochemistry*, Fifth., New York, NY: W H Freeman, 2002.
- [16] F. Q. Nuttall, A. Ngo, and M. C. Gannon, "Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant?," *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, vol. 24, no. 6, ss. 438–458, Sep. 2008.
- [17] J. Koolman and K.-H. Röhm, *Color Atlas of Biochemistry*, First. Stuttgart, New York: Thieme, 1996.
- [18] B. Borgström, "Citronsyracykeln - Uppslagsverk - NE." [Online]. Tillgänglig: <http://www.ne.se.proxy.lib.chalmers.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/citronsyracykel> n. [Hämtad: 21-Mar-2017].
- [19] C. K. Mathews, K. E. (Kensal E. Van Holde, and K. G. Ahern, *Biochemistry*, Third. Benjamin Cummings, 2000.
- [20] B. Alberts, J. Wilson, and T. Hunt, *Molecular biology of the cell*, Fifth. Garland Science, 2008.
- [21] L. O. Björn, "Fosforylering," *Uppslagsverk - NE*. 2017.
- [22] "Andningskedja," *Uppslagsverk - NE*. 2017.
- [23] M. T. Madigan, J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. (Daniel H. Buckley, and D. A. Stahl, *Brock biology of microorganisms*, Fourteenth. Pearson, cop. 2015, 2015.
- [24] "Lactate (CHEBI:24996)," *EMBL-EBI*, 2015. [Online]. Tillgänglig: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/chebiOntology.do?chebiId=CHEBI:24996>. [Hämtad: 26-Apr-2017].
- [25] J. L. J. M. Scheijen, N. M. J. Hanssen, M. P. H. van de Waarenburg, D. M. A. E. Jonkers, C. D. A. Stehouwer, and C. G. Schalkwijk, "L(+) and D(-) lactate are increased in plasma and urine samples of type 2 diabetes as measured by a

- simultaneous quantification of L(+) and D(-) lactate by reversed-phase liquid chromatography tandem mass spectrometry.,” *Exp. Diabetes Res.*, vol. 2012, s. 1, 2012.
- [26] National Center for Biotechnology Information, “Lactate.” [Online]. Tillgänglig: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/lactate#section=Top>. [Hämtad: 24-Apr-2017].
- [27] C. E. Ophardt, “Cori Cycle,” *Virtual Chembook*, 2003. [Online]. Tillgänglig: <http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/615coricycle.html>. [Hämtad: 24-Apr-2017].
- [28] K. Sahlin, “Återhämtning Av Styrka Och Uthållighet Efter Hårt Arbete,” *Sven. Idrottsforskning*, ss. 1–4, 2008.
- [29] J. Finsterer, “Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise,” *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 13, no. 1, s. 218, Dec. 2012.
- [30] N. Psychogios *et al.*, “The human serum metabolome,” *PLoS One*, vol. 6, no. 2, 2011.
- [31] K. K. Pasikanti, P. C. Ho, and E. C. Y. Chan, “Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 871, no. 2, ss. 202–211, 2008.
- [32] L. Liu *et al.*, “Differences in metabolite profile between blood plasma and serum,” *Anal. Biochem.*, vol. 406, no. 2, ss. 105–112, 2010.
- [33] L. Conley and R. S. Schwartz, “Blood,” *Encyclopædia Britannica*. 2016.
- [34] J. Schaller, S. Gerber, and K. Urs, *Human blood plasma proteins: Structure and function*, First. Wiley, 2008.
- [35] J. A *et al.*, “Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome.,” *Anal Chem*, vol. 77, no. 24, ss. 8086–8094, 2005.
- [36] H. Kanani, P. K. Chrysanthopoulos, and M. I. Klapa, “Standardizing GC-MS metabolomics,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 871, no. 2, ss. 191–201, 2008.
- [37] P. Jonsson *et al.*, “High-throughput data analysis for detecting and identifying differences between samples in GC/MS-based metabolomic analyses,” *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 17, ss. 5635–5642, 2005.
- [38] H.-J. Hübschmann, *Handbook of GC-MS Fundamentals and applications*, Third. Wiley, 2015.
- [39] O. I. Savolainen, A. S. Sandberg, and A. B. Ross, “A Simultaneous Metabolic Profiling and Quantitative Multimetabolite Metabolomic Method for Human Plasma Using Gas-Chromatography Tandem Mass Spectrometry,” *J. Proteome Res.*, vol. 15, no. 1, ss. 259–265, 2016.
- [40] “Sekundärmetabolit,” *Uppslagsverk - NE*. 2017.
- [41] C. Poole, *Gas Chromatography*, First. Elsevier Inc., 2012.
- [42] F. G. Kitson, B. S. Larsen, and C. N. McEwen, *Gas chromatography and Mass spectrometry – A practical guide*, First. Elsevier Inc., 1996.
- [43] W. Jennings, *Gas Chromatography with Glass Capillary Columns*, First. Elsevier Inc., 1978.
- [44] H. J. Gross, *Mass spectrometry - A Textbook*, Second. Springer, 2011.
- [45] K. Downward, *Mass spectrometry: A foundation course*, First. The Royal Society of Chemistry, 2004.
- [46] L. Eriksson, E. Johannson, N. Kattaneh, and S. Wold, *Multi-and megavariate Data Analysis Principles and Applications*. Umetrics Academy, 2001.
- [47] J. F. Hair Jr, W. C. Black, B. J. Babin, and R. E. Andersom, *Multivariate Data Analysis: Pearson New International Edition*, Seventh. Pearson Aducation M. U. A, 2013.
- [48] H. Abdi, “Partial least squares regression and projection on latent structure regression

- (PLS Regression),” *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.*, vol. 2, no. 1, ss. 97–106, 2010.
- [49] S. Huang, “When correlation and causation coincide,” *BioEssays*, vol. 36, no. 1, ss. 1–2, 2014.
- [50] “Ketoleucine (YMDB00388),” *The Yeast Metabolome Database (YMDB)*. 2017.
- [51] “3-hydroxybutyric acid,” *PubChem*. 2017.
- [52] J. K. Elmquist *et al.*, “Exercise promotes the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) through the action of the ketone body b- hydroxybutyrate,” 2016.
- [53] “Showing metabocard for Adenosine monophosphate (HMDB00045)No Title,” *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [54] R. E. Simpson and J. W. Phillis, “Adenosine in exercise adaptation,” *Br J Sp Med*, vol. 26, no. 1, ss. 1–5, 1992.
- [55] “Showing metabocard for Adenosine (HMDB00050),” *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [56] “Showing metabocard for L-Alanine (HMDB00161),” *Human Metabolome Database (HMDB)*, 2017. [Online]. Tillgänglig: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00161>.
- [57] P. Felig, “The glucose-alanine cycle,” *Metabolism*, vol. 22, no. 2, ss. 179–207, Feb. 1973.
- [58] “Showing metabocard for Succinic acid (HMDB00254),” *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [59] “Showing metabocard for Cellobiose (HMDB00055),” *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [60] Y. Zhao, W.-J. Lu, and H.-T. Wang, “Supercritical hydrolysis of cellulose for oligosaccharide production in combined technology,” *Chem. Eng. J.*, vol. 150, no. 2–3, ss. 411–417, Aug. 2009.
- [61] “Showing metabocard for L-Cysteine (HMDB00574),” *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [62] “Showing metabocard for Arachidic acid (HMDB02212),” *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [63] “Showing metabocard for Glucose 6-phosphate (HMDB01401),” *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [64] “Showing metabocard for Glyceric acid (HMDB00139),” *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [65] “Showing metabocard for Lactitol (HMDB40937),” *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [66] “Lyxos,” *Uppslagsverk - NE*. 2017.
- [67] “Showing metabocard for N-Acetyl-D-glucosamine (HMDB00215),” *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [68] J.-K. Chen, C.-R. Shen, and C.-L. Liu, “N-acetylglucosamine: production and applications.,” *Mar. Drugs*, vol. 8, no. 9, s. 2493, Sep. 2010.
- [69] K. Rogers, “Norepinephrine,” *Encyclopædia Britannica*. 2017.
- [70] “Showing metabocard for Norepinephrine (HMDB00216),” *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [71] “Oljesyra,” *Uppslagsverk - NE*. 2017.
- [72] “Showing metabocard for Ornithine (HMDB00214),” *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [73] T. Sugino, T. Shirai, Y. Kajimoto, and O. Kajimoto, “l-Ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism,” *Nutr. Res.*, vol. 28, no. 11, ss. 738–743, Nov. 2008.
- [74] “Showing metabocard for Pyruvic acid (HMDB00243),” *Human Metabolome*

- Database (HMDB)*. 2017.
- [75] D. Kalman, C. M. Colker, I. Wilets, J. B. Roufs, and J. Antonio, "The effects of pyruvate supplementation on body composition in overweight individuals.," *Nutrition*, vol. 15, no. 5, ss. 337–340, May 1999.
- [76] "Human Metabolome Database: Showing metabocard for Salicin (HMDB03546)," *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [77] "Aspirin® - FASS Allmänhet," *FASS*, 2013. [Online]. Tillgänglig: <http://www.fass.se/LIF/product?nplId=19350131000010>. [Hämtad: 03-May-2017].
- [78] "Showing metabocard for Sinapyl alcohol (HMDB13070)," *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [79] R. Zhou and L. Cheng, "Competitive inhibition of phosphoglucose isomerase of apple leaves by sorbitol 6-phosphate," *J. Plant Physiol.*, vol. 165, no. 9, ss. 903–910, Jun. 2008.
- [80] "Showing metabocard for L-Tryptophan (HMDB00929)," *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [81] M. Kent, "Serotonin (entramine; 5-hydroxytryptamine)," in *Food and Fitness: A Dictionary of Diet and Exercise*, Second., Oxford University Press, 2016.
- [82] J. H. . Huck, B. Roos, C. Jakobs, M. S. van der Knaap, and N. M. Verhoeven, "Evaluation of pentitol metabolism in mammalian tissues provides new insight into disorders of human sugar metabolism," *Mol. Genet. Metab.*, vol. 82, no. 3, ss. 231–237, Jul. 2004.
- [83] I. Thiele *et al.*, "A community-driven global reconstruction of human metabolism," *Nat. Biotechnol.*, vol. 31, no. 5, ss. 419–425, Mar. 2013.
- [84] "Malic Acid," *Human Metabolome Database (HMDB)*. 2017.
- [85] D. A. Bender, "Malic acid," in *A Dictionary of Food and Nutrition*, Fourth., Oxford University Press, 2014.
- [86] F. Qiang, "Effect of Malate-oligosaccharide Solution on Antioxidant Capacity of Endurance Athletes.," *Open Biomed. Eng. J.*, vol. 9, s. 326, 2015.
- [87] Juoj8~commonswiki, "File:Glykolysen.svg - Wikimedia Commons." [Online]. Tillgänglig: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glykolysen.svg>. [Hämtad: 28-Apr-2017].
- [88] CFCE, "File:2507 The Krebs Cycle.jpg - Wikimedia Commons," 2017. [Online]. Tillgänglig: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2507_The_Krebs_Cycle.jpg. [Hämtad: 12-May-2017].
- [89] CFCE, "File:Figure 07 04 01.jpg - Wikimedia Commons." [Online]. Tillgänglig: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Figure_07_04_01.jpg. [Hämtad: 28-Apr-2017].
- [90] E. B. Petaholmes, PDH, "File:Cori Cycle.SVG - Wikimedia Commons," 2011. [Online]. Tillgänglig: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cori_Cycle.SVG. [Hämtad: 10-May-2017].
- [91] Offnfopt, "File:Gas chromatograph-vector.svg - Wikimedia Commons." [Online]. Tillgänglig: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gas_chromatograph-vector.svg. [Hämtad: 28-Apr-2017].
- [92] K. Murray, "File:Gcms schematic.gif - Wikimedia Commons." [Online]. Tillgänglig: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gcms_schematic.gif. [Hämtad: 28-Apr-2017].
- [93] Kermit Murray, "File:Ms block schematic.gif - Wikimedia Commons." [Online]. Tillgänglig: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ms_block_schematic.gif. [Hämtad: 02-May-2017].
- [94] Angelus, "File:Quadrupole mass analyzer.svg - Wikimedia Commons." [Online].

- Tillgänglig: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Quadrupole_mass_analyzer.svg. [Hämtad: 28-Apr-2017].
- [95] Egmason, "File:Electron multiplier.svg - Wikimedia Commons." [Online]. Tillgänglig: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Electron_multiplier.svg. [Hämtad: 28-Apr-2017].
- [96] Vladislav Andriashvili, "File:Hexanal edited.gif - Wikimedia Commons." [Online]. Tillgänglig: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hexanal_edited.gif. [Hämtad: 28-Apr-2017].

Bilaga 1 – Etikansökan

ANSÖKAN OM ETIKPRÖVNING

1

ANSÖKAN OM ETIKPRÖVNING

se anvisning sid. 16

Uppgifter som fylls i av den regionala etikprövningsnämnden

Ankomstdatum:	Dnr:
Avgift inbetald datum:	Begäran om komplettering av ansökan:
Ansökan komplett:	Begäran om ytterligare information:
Begärd information inkommen:	Beslutsdatum:

Uppgifter som fylls i av sökanden

Till Regionala etikprövningsnämnden i: **Göteborg**
(Den regionala etikprövningsnämnd till vars upptagningsområde forskningshuvudmannen hör,
se www.forskningsetikprovning.se)

Projekt

Ange en beskrivande titel på svenska för lekmän, utan sekretesskyddad information.
Ange också i förekommande fall projektets identitet, projektets/forskningsplanens (protokollets eller
prövningsplanens) nummer, version, datum osv.

Laktatmetabolism under fysisk ansträngning: Sökning av korrelationer mellan laktatvärden och metabolitkoncentrationer i blodet hos idrottare (simmare) under fysisk ansträngning.

Projektnummer/identitet: Version nummer:

Ansökan avser (gäller även vid begäran om rådgivande yttrande):

- forskning där endast en forskningshuvudman deltar (5000 kr)
- forskning där fler än en huvudman deltar (16000 kr)
- forskning där mer än en forskningshuvudman deltar, men där samtliga forskningspersoner eller forskningsobjekt enligt 4 § lagen (2003:460) om etikprövning av forskning som avser människor, har ett omedelbart samband endast med en av forskningshuvudmännen (5000 kr)
- endast behandling av personuppgifter (5000 kr)
- forskning som gäller klinisk läkemedelsprövning (16000 kr)
- ändring av tidigare godkänd ansökan (enligt 4 §) (2000 kr)

Om nämnden finner att studien/forskningsprojektet inte faller inom lagens för etikprövning tillämpningsområde önskas ett rådgivande yttrande

Ja: Nej:

1. Information om forskningshuvudman m.m.

1:1 Sökande forskningshuvudman

Ansökan om etikprövning av forskning skall göras av forskningshuvudmannen. *Med forskningshuvudman avses en statlig myndighet eller en fysisk eller juridisk person i vars verksamhet forskningen utförs.* Inom staten utförs forskning främst vid lärosätena, men även vid vissa andra myndigheter, som t.ex. Brottsförebyggande rådet och Socialstyrelsen. Kommuner och landsting kan vara forskningshuvudmän, liksom privaträttsliga juridiska personer.

Namn: Chalmers Tekniska Högskola

Adress: Maskingränd 2, 412 58 Göteborg

1:2 Behörig företrädare

Behörig företrädare för forskningshuvudmannen (t.ex. prefekt, enhetschef, verksamhetschef).
Forskningshuvudmännen bestämmer själva, genom interna arbets- och delegationsordningar eller genom fullmakt, vem som är behörig att företräda forskningshuvudmannen. Bifoga kopia av sådan handling.

Namn: Gunnar Westman

Tjänstetitel: Biträdande professor

Adress: Organisk kemi, Kemigården 4, 412 58 Göteborg

1:3 Forskare som är huvudansvarig för genomförandet av projektet (kontaktperson)

Namn: Gunnar Westman

Adress: Organisk kemi, Kemigården 4, 412 58 Göteborg

E-postadress: westman@chalmers.se

Telefon: +46 31 772 30 72

Mobiltelefon:

1:4 Plats

Plats/er där projektet skall genomföras (ange inrättning/ar, institution/er, klinik/er etc.).

Organisk kemi, Kemigården 4, 412 58 Göteborg
Eriksdalsbadet, Hammarby Slussväg 20, 118 60 Stockholm

1:5 Andra medverkande

Övriga deltagande forskningshuvudmän samt forskare ansvariga att lokalt genomföra projektet (kontaktpersoner) skall anges i bilaga (namn, adresser).

1:6 Vid läkemedelsprövning

Ansökan om tillstånd har insänts till Läkemedelsverket.

Ansökan inlämnad (datum):

Tillstånd erhållits

1:7 Vid viss genetisk forskning

Anmälan till *Datainspektionen* om förhandskontroll av behandling av personuppgifter om genetiska anlag som framkommit efter genetisk undersökning (10 § första stycket 2 personuppgiftsförordningen (1998:1191)).

Inlämnad (datum): Kommer att inlämnas efter godkänd etikprövning

2. Uppgifter om projektet**2:1 Sammanfattande beskrivning av forskningsprojektet (programmet)**

Beskrivningen skall kunna förstås av nämndens lekmän. Undvik därför terminologi som kräver specialkunskaper. Ange bakgrund och syfte för studien samt den (de) vetenskapliga frågeställning (ar) som man söker svar på. Ange de viktigaste undersökningsvariablerna. Ange vilka kunskapsvinster projektet kan förväntas ge och betydelsen av dessa. Ange om det är en registerstudie, uppdragsforskning etc. För fackmän avsedd detaljerad information i protokoll eller forskningsplan *skall* bifogas som bilaga. En utförligare beskrivning över genomförandet *avsedd för lekmän* kan vid behov bifogas den för fackmän avsedda obligatoriska forskningsplanen.

Under fysisk ansträngning är det många idrottare som får mjölksyraansamling vid begränsande syretillförsel orsakad av den fysiska påfrestningen. Mjölksyran bryts ned till laktat, som kroppen vidare använder för att producera energi via anaeroba processer. Många studier pekar på att laktat är en biomarkör för trötthet, alltså att laktatet tyder på att kroppen inte kan producera tillräckligt med energi via aeroba processer. Forskning inom området laktatmetabolism under fysisk ansträngning är idag begränsad. Mycket är fortfarande endast spekulationer för att inga studier har kunnat fastställa huruvida laktat är en biomarkör eller direkt orsak till trötthet. En grupp studenter från Chalmers Tekniska Högskola ska därför utföra en studie, ett sk. kandidatarbete, där laktatmetabolism studeras hos idrottare under fysisk ansträngning.

Det primära syftet med studien är att undersöka om det finns en korrelation mellan halter av olika metaboliter involverade specifikt i laktatmetabolism hos idrottare under fysisk ansträngning. Denna undersökning är relevant eftersom en sådan eventuell korrelation troligtvis skulle kunna bidra med kunskap för att skapa en metod att optimera simmarens prestation, uthållighet och återhämtning. Denna optimering är tänkt att ske genom en kostförändring genom att kontrollera nivåerna av ämnen som förmodligen orsakar trötthet. Studien syftar även till att lägga en grund för vidare forskning inom området laktatmetabolism.

Den vetenskapliga frågeställningen är: finns det korrelationer mellan laktat och andra metaboliter i blodet som är detekterbara under fysisk ansträngning?

Det praktiska i studien kommer bestå av blodprovstagning på idrottare under fysisk ansträngning, dvs under intensiv fysisk träning i form av simning. Blodprovtagningen kommer att ske i Eriksdalsbadet på idrottare med utrustning för att möjliggöra blodprovstagning från öra, alltså engångsstickor, laktatpapper, laktatmätare, pipetter, Eppendorfrör.

Det som ska levereras är rapporter till Chalmers: resultat från studien och förhoppningsvis grund för vidare forskning, men även till simmare/tränare: resultat sammanfattat i en rapport på en lekmanns förståelsenivå så att de kan applicera kunskapen för att eventuellt förändra upplägg (kost) för prestationsoptimering.

2:2 Vilken primär vetenskaplig frågeställning ligger till grund för projektets utformning

Om projektet kan karakteriseras som en hypotesprövning, ange den primära och eventuellt sekundära hypotesen. Hänvisning till mer detaljerad information för fackmän kan ske till bifogat protokoll eller forskningsplan enligt 2:1

1. Den primära frågeställningen är om det finns korrelationer mellan laktatvärden och vissa specificerade metabolithalter i blodet under fysisk ansträngning för att undersöka om man kan påverka dessa värden i avseendet att optimera fysisk prestation
2. Den sekundära frågeställningen är om denna studie kan ligga till grund för fortsatt forskning inom området laktatmetabolism, eller om studien kan förkastas

2:3 Redogör för resultat från relevanta djurförsök

För viss, främst medicinsk, forskning ange skälen till att djurförsök inte utförts.

Det finns oss veterligt inga djurförsök publicerade med avseende på laktatmetabolism under fysisk ansträngning.

2:4 Redogör översiktligt för undersökningsprocedur, datainsamling och datas karaktär

Av beskrivningen skall framgå hur studien planeras genomföras. Beskriv insamlade datas karaktär. Hur säkerställs datas tillförlitlighet (t.ex. kvalitetskontroll/monitorering)? - Vid enkäter och intervjuer skall beskrivas tillvägagångssätt och t.ex. frågors innehåll och hur slutsatser dras. Enkäter och skattningsskalor skall bifogas. - För medicinsk forskning skall anges t.ex. typer av ingrepp, mätmetoder, antal besök, tidsåtgång vid varje försök, doser och administrationssätt för eventuella läkemedel och/eller isotoper, blodprovsmängd (även ackumulerad mängd vid multipla försök). Ange även om och på vilket sätt undersökningsprocedur m.m. skiljer sig från klinisk rutin. Ange proceduren för att ge den eventuella behandling efter studiens slut, som kan erfordras. Ange procedur för insamling av biologiskt material. Redogör för datakällor och procedurer vid behandling av personuppgifter. För mer detaljerad information kan hänvisning ske till bilagt protokoll eller forskningsplan enligt 2:1.

STUDIEPOPULATION:

3-5 personer kommer erbjudas att ställa upp som forskningspersoner. Dessa personer är simmare som tränar på NEC, Nationellt Elit Centra, i Stockholm. Kön eller ålder har ingen betydelse för provtagningen - dock kan eventuella skillnader uppkomma i analysen beroende på variabler som kön och ålder, men dessa tas ej någon hänsyn till vid provtagning. Ålder kan komma att variera mellan 18 år till 35 år, likaså kan kön variera. De simmare som deltar i studien kommer att ge sitt samtycke muntligt och skriftligt efter att ha tagit del av information innehållande syftet med studien, metod vid provtagningen och analys samt användning av resultat. Forskningspersonerna kommer att svara på frågor angående kost och hälsa för att eventuellt kunna bekräfta resultat i studiens slutskede, det vill säga resultatet av den analyserade datan erhållen efter experimentell analys av proverna. Resultatet från en individs provtagning kommer

redovisas på så sätt att individen är anonym. Ett kontrakt mellan forskningshuvudman och forskningspersoner innehållande samtycke kommer upprättas (v g se bilaga 4). Provtagningen består av blodprover som kommer analyseras genom laktatmätning, LC-MS (vätskekromatografi kopplad till masspektrometri) och eventuellt NMR (kärnmagnetisk resonans).

PROTOKOLL (metod):

Genom att sticka hål i örat på forskningspersonen med engångssticka kommer blodprov att erhållas, varefter blodet ska överföras till laktatpapper samt med hjälp av pipett till Eppendorfrör. Uppsamling av blod vid upprepade stickningar kommer kontinuerligt ske då forskningspersonen i fråga utsätter sig för fysisk ansträngning där intensiteten trappas upp. Forskningspersonen kommer att i största möjliga mån utsättas för fysisk påfrestning för att kunna producera laktat. Både laktat och glukos kommer att mätas direkt med hjälp av laktatmätare. Målsättningen är att ta ca 10-20 prov, varav hälften är kontrollprov, under ansträngningen per forskningsperson. Två prov kommer alltså tas vid samma tillfälle för dubbel upplaga. Den maximala mängd blod som krävs för varje prov kommer ej överstiga 200 mikroliter. Antalet forskningspersoner kommer förmodligen uppgå till tre idrottare, ej över fem. Blodprovtagning kommer även att ske en gång innan fysisk ansträngning, en gång efter kort återhämtning samt en gång vid följande träningstillfälle. Det totala antalet prover i Eppendorfrör som kommer analyseras kommer ej överstiga 200. Vid provtagningstillfället kommer alla Eppendorfrör att frysas ner med hjälp av kolsyreis för att bevara det biologiska materialet intakt, varefter det ska transporteras till Chalmers för LC-MS och eventuellt NMR. Proverna kommer maximalt att hållas nedfrusna under en vecka, förutom kontrollproverna som kommer bevaras nedfrusna i maximalt 2 månader. Kontrollproverna kommer att slängas om de ej analyseras senast 12 maj, 2017.

Blodproverna kommer behandlas inför kromatografianalys genom att centrifugeras, då det är blodplasman som är av intresse vid mätning av metabolithalterna. Den metod som kommer användas är vätskekromatografi där innehållet i proverna kommer separeras varpå massorna av de specificerade metaboliterna detekteras. V g se bilaga 2.

DATABEARBETNING

Blodproverna kommer behandlas inför experimentell analys med LC-MS. Vätskekromatografisk HPLC kommer utföras på proverna vilket innebär separation av specificerade metaboliter i blodplasman följt av detektion av massorna av dessa. Data från LC-MS kommer därefter analyseras teoretiskt av studiegruppen bestående av studenter i syfte att finna svar på den vetenskapliga frågeställningen. Datan kommer att presenteras i en vetenskaplig rapport där slutsatser utifrån syfte kommer redovisas. Datan kommer även att redovisas genom formell muntlig presentation för forskningshuvudman. En rapport kommer även levereras till forskningspersoner för att dessa ska kunna dra nytta av resultatet. V g se bilaga 2.

2:5 Redogör för om insamlat biologiskt material kommer att förvaras i en biobank

Med biobank avses biologiskt material från en eller flera människor som samlas och bevaras tills vidare eller för en bestämd tid och vars ursprung kan härledas till den eller de människor från vilka materialet härrör.

Redogör för var och hur prover som skall sparas förvaras, kodningsprocedurer och villkor för utlämnande av prover. Observera att i förekommande fall skall anmälan av biobank ske till Socialstyrelsen enligt lagen (2002:297) om biobanker i hälso- och sjukvården m.m.

Blodprover kommer att tas från varje forskningsperson under fysisk ansträngning vid tre träningstillfällen under en period på maximalt 48 timmar. Proverna kommer att samlas i Eppendorfrör och frysas ned för vidare bevaring innan experimentell analys är möjlig. Prover kommer bevaras nedfrysta på Chalmers Tekniska Högskola i maximalt en vecka innan analys, förutom kontrollprover vilka utgör hälften av proverna och kommer bevaras upp till ca 2 månader. Efter 12 maj, 2017 kommer alla prov vara avverkade eller deponerade.

2:6 Redovisa tillgång till nödvändiga resurser under hela projektets genomförande

Ange vilka som har ansvaret (prefekt, verksamhetschef eller motsvarande) för forskningspersonernas säkerhet vid alla enheter/kliniker där patienter ingår samt att erforderliga ekonomiska och personella resurser finns tillgängliga. Intyg från dessa skall bifogas.

Handledare för studien Gunnar Westman är behörig företrädare för forskningshuvudman och ansvarar för att studien fullföljs enligt detta protokoll. Avdelningen för Organisk kemi på Chalmers Tekniska Högskola har särskilda personella resurser, begränsade ekonomiska resurser samt studenter för att arbeta med detta projekt. V g se bifogat resursintyg (bilaga 9).

2:7 Journalföring, registrering och hantering av data

Redogör för hur undersökningsprocedurer och eventuella ingrepp journalförs. Ange hur registrering och behandling av resultaten skall gå till. Om materialet skall kodas, ange proceduren, vem som förvarar kodlistor och vem eller vilka som har tillgång till dem, var de förvaras, hur länge samt om materialet kommer att anonymiseras eller förstöras. Används band- och videoinspelningar? Vilken tillgänglighet har datamaterialet? Hur förvaras det? Hur erhålls erforderligt sekretesskydd?

Forskningspersonuppgifter från studien kommer att dokumenteras och databehandlas. Dessa uppgifter kommer behandlas efter kontrakt upprättat mellan forskningshuvudman och forskningspersoner, och ingen obehörig kommer att ha tillgång till dokumentationen. Vid databearbetning kommer namn att ersättas med en kod om den enskilde individen, så att denne inte kan urskiljas. Endast en ansvarig för studien har tillgång till "kodnyckeln". Då data från studien publiceras kommer enskilda individer inte att kunna identifieras. Hanteringen av personuppgifter regleras av Personuppgiftslagen (SFS1998:204).

2:8 Redogör för tidigare erfarenheter (egna och/eller andras) av den använda proceduren, tekniken eller behandlingen

Särskilt angeläget är att redovisning av risker för komplikationer görs tydliga och i förekommande fall med angivande av relevanta publikationer. Om ansökan avser fortsättning eller uppföljning av tidigare projekt, ange diarienummer samt datum för beslut av tidigare godkänd ansökan. Vid nya läkemedelsbehandlingar av patienter bör anges hur många patienter (med aktuell eller annan åkomma) som tidigare erhållit föreslagen eller högre dosering samt hur långa behandlingsperioder som studerats.

Blodprovtagning som skall användas i den aktuella studien är inte förbunden med några risker för forskningspersonerna då ytterst liten mängd blod skall samlas. Den valda mängden blod är baserad på gängse rekommendationer för kromatografibehandling av proverna. Baserat på protokollet som utgör metodbeskrivningen finns det såväl kliniskt som forskningsmässigt lång erfarenhet av dessa mätningar och behandlingar. Det finns oss veterligt inga publicerade studier om korrelationer mellan laktat och specifika metaboliter.

3. Uppgifter om forskningspersoner

3:1 Hur görs urvalet av forskningspersoner

Med forskningsperson avses en levande människa som forskningen avser.

Ange urvalskriterier (inklusion och exklusion). På vilket sätt kommer forskaren i kontakt med/får kännedom om lämpliga forskningspersoner? Ange om rekrytering sker från (egna, andras) tidigare eller pågående studier. Om annonsering sker, skall annonsmaterialet insändas som bilaga. Om t.ex. barn, eller personer som tillfälligt eller permanent inte är kapabla att ge ett eget informerat samtycke skall tillfrågas om deltagande i projektet, skall detta särskilt motiveras. Om vissa grupper (t.ex. kvinnor, barn eller äldre) utesluts från deltagande i projektet skall detta särskilt motiveras.

Forskningspersonerna skall vara atleter inom simning som ingår i en exklusiv träningsgrupp på Nationellt Elit Centra, NEC, i Stockholm. Studien begränsas inte av åldersgränser, men simmarna kommer befinna sig i åldersspannet 18-35 år. Likaså begränsas inte studien av kön. Evetueella skillnader kan uppkomma i analysen beroende på variablerna kön och ålder, men dessa tas ej någon hänsyn till då variation av metabolithalter hos varje enskild individ är det primära målet av studera. Lämpliga forskningspersoner kommer att sökas genom direkt förfrågan. Endast forskningspersoner kan ge ett eget skriftligt samtycka kan delta i studien.

3:2 Ange relationen mellan forskare/försöksledare och forskningspersonerna

- Behandlare (t.ex. läkare, psykolog, sjukgymnast) - forskningsperson (t.ex. patient, klient)
- Kursgivare (lärare) - student
- Arbetsgivare - anställd
- Annan relation. Beskriv:

3:3 Redogör för det statistiska underlaget för studiepopulationens (ernas)/ undersökningsmaterialets(-ens) storlek

Redovisa en statistisk styrka, så kallad "power"-beräkning eller motsvarande överväganden för tydliggörande av studiens möjligheter att besvara frågeställningarna.

Denna studie kan i praktiken utföras på alla individer då alla människor producerar laktat och har specificerade metaboliter i blodet. Valet av forskningspersoner grundas på att denna grupp i en större utsträckning utsätter sig för fysisk ansträngning och därmed ökar sannolikheten för produktion av laktat. Generellt har idrottsutövare ett större behov av att ta del av den kunskap frågeställningen söker svar på då resultatet av studien förhoppningsvis kan tillämpas för optimering av träning.

Det finns stor osäkerhet att frågeställningen huruvida korrelationer existerar samt är detekterbara kommer bli besvarad, då studien är begränsad både i avseende av ekonomi och tid. I och med att ingen liknande studie oss veterligen tidigare utförts finns alltså ingen garanti att frågeställning 1 kommer bli besvarad. Utifrån resurser har vi därför beslutat att 3-5 individer skall delta i studien för förmodat optimalt resultat utifrån begränsningarna.

3:4 Kan forskningspersonerna komma att inkluderas i flera studier samtidigt eller i nära anslutning till denna studie

Ange om forskningspersonerna kan inkluderas samtidigt i flera studier eller i nära anslutning till denna studie. Ange i så fall projektitel, forskningshuvudman, forskare som genomför studien (kontaktperson) samt diarienummer (om känt) för de övriga studierna. När avslutades ett eventuellt tidigare deltagande?

Nej.

3:5 Vilket försäkringsskydd finns för de forskningspersoner som deltar i projektet

Det åligger forskningshuvudmannen att kontrollera att befintliga försäkringar täcker eventuella skador som kan uppkomma.

Vet inte.

3:6 Vilken ekonomisk ersättning eller andra förmåner utgår till de forskningspersoner som deltar i projektet och när betalas ersättningen ut (Utförligare beskrivning kan lämnas i bilaga)

Ersättning för obehag och besvär. Belopp (före skatt): 0

Ersättning för förlorad arbetsinkomst Ja Nej

Reseersättning Ja Nej

Befrielse från kostnader för läkemedel Ja Nej

Befrielse från andra kostnader. Vilka?

Andra förmåner. Vilka?

När betalas ersättningen ut?

Ingen ersättning betalas ut

4. Information och samtycke

4:1 Proceduren för och innehållet i den *information som lämnas då forskningspersoner tillfrågas om deltagande*

Beskriv hur och när information ges och vad den innehåller. Vem informerar? Normalt skall en kortfattad och lättförståelig skriftlig information ges. Denna skriftliga information skall bifogas ansökan. Om ingen eller ofullständig information ges, måste skälen för detta noggrant anges.

Forskningspersonen skall informeras om

- den övergripande planen för forskningen
- syftet med forskningen
- de metoder som kommer att användas
- de följder och risker som forskningen kan medföra
- vem som är forskningshuvudman och kontaktperson
- att deltagandet i forskningen är frivilligt och
- forskningspersonens rätt att när som helst avbryta sin medverkan.

4:2 Hur och från vem inhämtas *samtycke*

Beskriv proceduren; vem som frågar, när detta sker och hur samtycket dokumenteras. Utförlig redovisning är särskilt viktig då barn eller personer med nedsatt beslutskompetens ingår i studien, likaså vid studier av en grupp (grupper), t.ex. föreningar, organisationer, företag, kyrkosamfund och församlingar eller arbetet i en skolklass.

Muntligt och skriftligt samtycke inhämtas enligt ovan från forskningspersonen, alltså från simmaren. Samtycke dokumenteras med ett kontrakt som skrivs under av forskningsperson och behörig företrädare. Dokumentation kommer att ske i samband med provtagning.

5. Forskningsetiska överväganden

5:1 Redogör för risker som deltagandet kan medföra samt möjliga komplikationer

Detta kan vara t.ex. smärta, obehag eller integritetsintrång som projektet innebär eller kan innebära. Har åtgärder vidtagits för att förebygga de risker som sägs ovan? Vilken beredskap finns att hantera dessa komplikationer? Ange metoder som kommer att användas för att efterforska, registrera och rapportera oönskade händelser.

Blodprovtagning kan i många fall upplevas som obehagligt, men genom att provtagningen sker genom stick i örat samt att mängden blod som samlas från individen inte ger någon märkbar fysisk påverkan minskar obehaget.

Då biologiskt material skall insamlas och analyseras från forskningspersonerna kan frågor kring integritet uppdagas, men genom kontrakt kommer dessa problem undvikas då alla parter deltagande i studien skall vara medvetna om användningsområdet av det biologiska materialet innan provtagning utförs.

5:2 Redogör för förutsebar nytta för de forskningspersoner som ingår i projektet

Genom att delta i projektet kommer forskningspersonerna att bidra till ökad kunskap om laktatmetabolism och korrelationer mellan metaboliter under fysisk ansträngning. Individerna erbjuds att ta del av resultat för eventuell tillämpning för optimering av deras egna fysiska träning. Alla individer kommer vara anonyma under redovisning av studien.

5:3 Gör en egen värdering av förhållandet risk – nytta för de forskningspersoner som deltar

Risk för forskningspersoner att delta i studien är uppskattningsvis extremt liten. Nyttan är förhållandevis mycket större än risken då studien förhoppningsvis kommer ge tillämpningsområden för forskningspersonerna.

5:4 Identifiera och precisera vilka etiska problem t.ex. risk – nytta i ett vidare perspektiv som kan uppstå inom eller genom projektet

Den största etiska problematiken som kan uppkomma är huruvida det är etiskt försvarbart att samla biologiskt material för studiens syfte. Med den aktuella studien kommer vi förhoppningsvis att bidra till ökad förståelse kring laktatmetabolism. Detta kan i sin tur medföra förbättrade rutiner för vidare forskning inom området för laktatmetabolism under fysisk ansträngning.

6. Redovisning av resultaten**6:1 Hur garanteras forskningshuvudmannen och medverkande forskare tillgång till data (anges vid t.ex. uppdragsforskning) och vem ansvarar för databearbetning och rapportskrivning**

Vid uppdragsforskning anges hur forskningshuvudmannen och medverkande forskare garanteras tillgång till data och vem som ansvarar för databearbetning och rapportskrivning.

Studien är ingen uppdragsforskning.

6:2 Hur kommer resultaten att göras offentligt tillgängliga

Kommer studien att insändas för publicering i tidskrift eller publiceras på annat sätt

Ange i vilken form resultaten planeras offentliggöras samt tidsplan för detta.

Studien ingår i planerat kandidatarbete för en grupp studenter med behörig företrädare som handledare vid Chalmers Tekniska Högskola.

6.3 På vilket sätt garanteras forskningspersonernas rätt till integritet när materialet offentliggörs/publiceras

Beskriv procedurer eller metod för avidentifiering/anonymisering. Redovisas endast resultat på statistisk gruppnivå?

Forskningspersonuppgifter från studien kommer att dokumenteras och databehandlas. Dessa uppgifter kommer behandlas efter kontrakt upprättat mellan forskningshuvudman och forskningspersoner, och ingen obehörig kommer att ha tillgång till dokumentationen. Vid databearbetning kommer namn att ersättas med en kod om den enskilde individen, så att denne inte kan urskiljas. Endast en ansvarig för studien har tillgång till "kodnyckeln". Då data från studien publiceras kommer enskilda individer inte att kunna identifieras.

7. Redovisning av ekonomiska förhållanden och

beroendeförhållanden

7:1 Vid uppdragsforskning

Ange uppdragsgivaren t.ex. vid klinisk läkemedelsprövning.

Namn:

Kontaktperson:

Adress:

Telefon/mobiltelefon:

Ange uppdragsgivarens relation till forskningshuvudmannen/medverkande forskare, t.ex. anställningsförhållande.

7:2 Redovisa eventuella ekonomiska överenskommelser med uppdragsgivare eller andra finansörer (namn, belopp)

Vid klinisk läkemedelsprövning kan hänvisning ske till ingånget avtal med sjukvårdshuvudmannen eller genom uppgift om föreslagen ersättning enligt överenskommelsen mellan Landstingsförbundet och LIF som bifogas. Separata överenskommelser med den/de som skall genomföra forskningen skall också redovisas. Om överenskommelserna inte är klara i sin helhet vid tidpunkten för ansökan skall belopp för studien/ersättning till kliniken/genomföraren och vad ersättningen skall täcka alternativt belopp per forskningsperson anges här. Vid studier där fler än en forskningshuvudman deltar skall principerna för och storleksordningen för ersättning för studien i sin helhet anges.

7:3 Redovisa forskningshuvudmannens och medverkande forskares intressen/tillgångar

Redovisa de som kan tänkas påverka tilltron till objektiviteten i genomförande och rapportering (t.ex. aktieinnehav eller konsultuppdrag i finansierande företag).

8. Förteckning över bilagor

Dokument som, i tillämpliga fall, skall bifogas om inte motsvarande information finns i blanketten har markerats med x. Markera de bilagor som skickas in med denna ansökan.

Insänd med ansökan	Bil nr	Beskrivning	Klinisk läkemedels prövning	Annan forskning
<input type="checkbox"/>	1 p 1:5	Deltagande forskningshuvudmän och medverkande forskare (kontaktpersoner) vid forskning där mer än en forskningshuvudman deltar	x	x
<input checked="" type="checkbox"/>	2 p 2:1	För fackmän avsedd projekt/forskningsplan (protokoll), vid behov även för lekmän avsedd bilaga	x	x
<input type="checkbox"/>	3 p 3:1	Annonsmaterial för rekrytering av forskningspersoner	x	x
<input checked="" type="checkbox"/>	4 p 4:1	Skriftlig information till dem som tillfrågas	x	x
<input type="checkbox"/>	5 p 2:4	Enkät, frågeformulär	x	x
<input type="checkbox"/>	6	Gemensam EU-blankett (gäller fr.o.m. den 1 maj 2004), gäller även vid ändring	x	
<input type="checkbox"/>	7	Sammanfattning av protokollet på svenska	x	
<input type="checkbox"/>	8	Prövarhandbok alt. bipacksedel/produktresumé	x	
<input checked="" type="checkbox"/>	9 p 2:6	Intyg från verksamhetschef/motsv. om resurser	x	x
<input type="checkbox"/>	10	CV för forskare (samma som p 1:3) med huvudansvar för genomförande (redovisa forskarens kompetens)	x	x
<input type="checkbox"/>	11 p 3:6	Beskrivning av ersättning till forskningspersoner	x	x
<input type="checkbox"/>	12 p 7:1 p 7:2	Överenskommelser med uppdragsgivare/finansiär om t.ex. anställningsförhållanden, bidrag/ersättning till prövningsplats, sjukvårdshuvudman, forskningshuvudman eller forskare	x	x
<input type="checkbox"/>	13	Tillstånd från strålskyddskommitté eller motsvarande	x	x

9. Undertecknande

Behörig företrädare för sökande forskningshuvudman enligt p 1:2.
--

Ort: Göteborg

Datum: 2017-02-15

Signatur

Namnförtydligande: **Gunnar Westman**

Undertecknad forskare som genomför projektet (kontaktperson) enligt p 1:3 intygar härmed att forskningen kommer att genomföras i enlighet med ansökan.
--

Ort: **Göteborg**

Datum: **2017-02-15**

Signatur

Namnförtydligande: **Gunnar Westman**

Anvisning för ansökan

Denna ansökningsblankett används vid ansökan om etikprövning enligt lagen (2003:460) om etikprövning av forskning som avser människor. Den är avsedd att användas för all slags forskning där godkännande skall inhämtas från en etikprövningsnämnd. Blanketten skall användas även vid begäran om rådgivande yttrande enligt 2 § förordning (2003:616) med instruktion för regionala etikprövningsnämnder. Beroende på vilken forskning som ansökan gäller kommer de uppgifter som efterfrågas nedan att ha olika relevans. Därmed

varierar också kravet på utförlighet i redovisningen av dessa. Markera på formuläret när uppgiften inte berör det aktuella projektet. Ansökan skall ifyllas så att den blir lättläst, dvs. den skall inte vara handskriven och inte skriven med liten stil och kort radavstånd. Blanketten skall skrivas på svenska.

Observera att en ansökan aldrig är komplett (och därmed kan behandlas) förrän blanketten är korrekt ifylld och avgiften är betald.

Ansökan med bilagor insändes i ett original och 16 kopior!

Om denna blankett

Allt som skall fyllas i är markerat grått. Övrig förklarande text är låst och får inte ändras. De grå fälten expanderar allteftersom du skriver, det finns alltså obegränsat utrymme för din text. Vid utskrift syns enbart texten du fyllt i och ej de grå fälten som syns på skärmen, det är därför viktigt att kontrollera att allt verkligen är ifyllt. När du är klar skriver du ut blanketten, kompletterar med erforderliga underskrifter samt bilagor och skickar till den regionala etikprövningsnämnd till vars upptagningsområde forskningshuvudmannen hör, se www.forskningsetikprovning.se.

Bilaga 2 – Det upprättade kontraktet



CHALMERS

Information om studie *Laktatmetabolism under fysisk ansträngning* för forskningspersoner

Existerar korrelationer mellan laktat och andra metaboliter?

Bakgrund och syfte

Under fysisk ansträngning är det många idrottare som får mjölksyraansamling vid begränsande syretillförsel orsakad av den fysiska påfrestningen. Mjölksyran bryts ned till laktat, som kroppen vidare använder för att producera energi via anaeroba processer. Många studier pekar på att laktat är en biomarkör för trötthet, alltså att laktatet tyder på att kroppen inte kan producera tillräckligt med energi via aeroba processer.

Forskning inom området laktatmetabolism under fysisk ansträngning är idag begränsad. Mycket är fortfarande endast spekulationer för att inga studier har kunnat fastställa huruvida laktat är en biomarkör eller direkt orsak till trötthet. En grupp studenter från Chalmers Tekniska Högskola ska därför utföra en studie, ett s.k. kandidatarbete, där laktatmetabolism studeras hos idrottare under fysisk ansträngning.

Det primära syftet med studien är att undersöka om det finns en korrelation mellan halter av olika metaboliter involverade specifikt i laktatmetabolism hos idrottare under fysisk ansträngning. Denna undersökning är relevant eftersom en sådan eventuell korrelation troligtvis skulle kunna bidra med kunskap för att skapa en metod för att optimera prestation, uthållighet och återhämtning. Denna optimering är tänkt att ske genom en kostförändring genom att kontrollera nivåerna av ämnen som förmodligen orsakar trötthet. Studien syftar även till att lägga en grund för vidare forskning inom området laktatmetabolism.

Den vetenskapliga frågeställningen är: *Finns det korrelationer mellan laktat och andra metaboliter i blodet som är detekterbara under fysisk ansträngning?*

Studiens genomförande och provtagning

Undersökningen görs under ett par träningspass i Din vanliga träningsmiljö. Utförandet av studien sker under samma förutsättningar som laktatmätningar som Du är van vid. Det enda som skiljer sig från de mätningar Din tränare har gjort förut, är att vi även kommer att ta blodprover med oss för att mäta halter av andra metaboliter. All information kommer att lagras på ett säkert sätt då Dina personuppgifter inte kommer att registreras eller presenteras.

Uppföljning efter studiens genomförande

När studien har avslutats kommer en rapport levereras till simmare och tränare där resultat sammanfattas så att det förhoppningsvis kan tillämpas för att eventuellt förändra kostupplägg för prestationsoptimering.

Kandidatarbete KBTX10-17-13
Institutionen för Kemi och bioteknik
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2017



CHALMERS

Tidsåtgång

Tiden för undersökningen kommer äga rum under två dagar, där vi tar prover under tre träningspass.

Risker

Blodprovstagning innebär inga risker för Dig vare sig på kort eller på lång sikt. Blodproverna kommer att bestå av en ytterst liten mängd volym, ca 4 ml totalt vid ett träningsstillfälle, vilket ej kommer påverka Dig fysiskt.

Fördelar

Genom denna studie undersöks Du med avseende på laktat och metaboliter för att eventuellt hitta en korrelation. Studiens resultat kan bidra till en ökad förståelse kring metabolism vid svar från experimentell analys. Resultaten kan även innebära förbättrade rutiner för metoden av denna typ av studie.

Hantering av data och sekretess

Personuppgifter från studien kommer att dokumenteras och databehandlas. Dina uppgifter är sekretesskyddade och ingen obehörig har tillgång till dokumentationen. Vid databearbetning kommer Ditt namn och personnummer att ersättas med en kod så att en enskild individ inte kan urskiljas. Endast den som är ansvarig för studien har tillgång till "kodnyckeln". Då data från studien eventuellt publiceras kommer enskilda individer inte att kunna identifieras. Hanteringen av Dina uppgifter regleras av Personuppgiftslagen (SFS1998:204).

Personuppgiftsansvar

Ansvarig för behandling av Dina personuppgifter är Chalmers Tekniska Högskola.

Biobank

De blodprov som tas i samband med denna studie kommer att lagras i en frys på Chalmers Tekniska Högskola. Proven kommer att förvaras kodade vilket innebär att de inte direkt kan härledas till Dig som person. Proven samt den tillhörande identifieringslista (kodnyckel) förvaras åtskilda och på ett säkert sätt. Proven får endast användas på det sätt som Du givit Ditt samtycke till. Du har full rätt att utan närmare förklaring begära att Dina prov skall aidentifieras, dvs de kan inte spåras till Din person. Alla prov kommer att analyseras och därefter förstöras senast 12 maj, 2017.

Ersättning

Någon ersättning för studiedeltagande ges ej.

Frivillighet

Ditt deltagande i studien är frivilligt och Du kan när som helst avbryta studien utan förklaring.

Kandidatarbete KBTX10-17-13
Institutionen för Kemi och bioteknik
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2017



CHALMERS

Tillfrågan om deltagande

Vi vill fråga Dig om Du skulle vilja delta i vår studie, under förutsättningen att under ett par av Dina träningspass som elitidrottare kommer vi ta blodprover för att mäta halten av laktat samt andra metaboliter.

Ansvariga, ytterligare information

Om Du önskar ytterligare information kan nedanstående personer kontaktas:

Gunnar Westman

behörig företrädare, forskare som har huvudansvaret för genomförandet av studien

Tel: +46 31 772 30 72

Mail: westman@chalmers.se

Lovisa Eriksson

kontaktperson från projektgruppen

Tel: +46 730848005

Mail: loveri@student.chalmers.se

Tack för att Du vill ställa upp och medverka i vårt kandidatarbete!

SKRIFTLIGT SAMTYCKE TILL DELTAGANDE I STUDIEN:

Laktatmetabolism under fysisk ansträngning

Jag har tagit del av den skriftliga informationen och samtycker till att delta i studien:

Gruppmedlem i kandidatarbetet som har givit information till deltagare:

Namnteckning

Namnteckning

Namnförtydligande

Namnförtydligande

Ort och datum

Ort och datum

Kandidatarbete KBTX10-17-13
Institutionen för Kemi och bioteknik
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2017

Bilaga 3 – Provtagningsprotokoll

Utrustning och material: pipett, pipettspetsar, engångspipetter, Eppendorfrör, centrifug, kolsyreis, is, frigolitlåda, laktatmätare, laktatstickor, lansetter och handskar.

1. Försökspersonen stacks två gånger i örat med lansetter och blod pipetterades från örat i omgångar. Blod fördes över till ett Eppendorfrör tills att en volym på minst 120 μ l uppnåts.
2. Samtidigt utfördes ett laktattest på det andra örat. Blodet samlades upp på en laktatsticka som fördes in i laktatmätaren, vilket registrerade ett värde.
3. Blodprovet från Steg 1 centrifugerades på 10 000 rpm i 10 minuter. Centrifugering skedde inom loppet av 5-10 minuter efter provtagning.
4. Under centrifugeringen bildades två faser, blodserum och röda blodkroppar. Därefter separerades faserna genom att serumet överfördes från provet med hjälp av en engångspipett till ett nytt Eppendorfrör medan de röda blodkroppar kasserades.
5. Eppendorfröret placerades sedan på is i en frigolitlåda. Det tog cirka 20 minuter från provtagning tills dess att röret placerades på is.

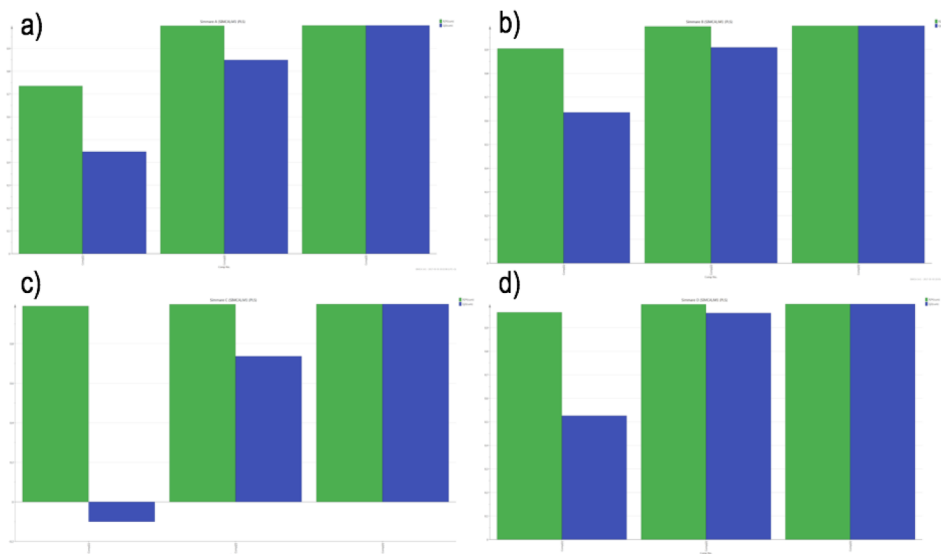
Bilaga 4 – GC-MS

Specifikationer:

GC-MS-analysen gjordes av Chalmers Mass Spectrometry Infrastructure, CMSI. Bärargasen bestod av helium och provet injicerades via en klyvd/icke-klyvd injektor vid 270°C. Kolonnpackningen bestod av 5 % fenyl och 95 % dimetylsiloxan. Kolonnen som utgjorde kopplingen mellan gaskromatografen och masspektrometer höll en temperatur på 290°C. Joniseringskällan som användes i masspektrometern var EI. Massanalysatorn som användes var en quadropole och jondetektorn var en elektronförstärkare.

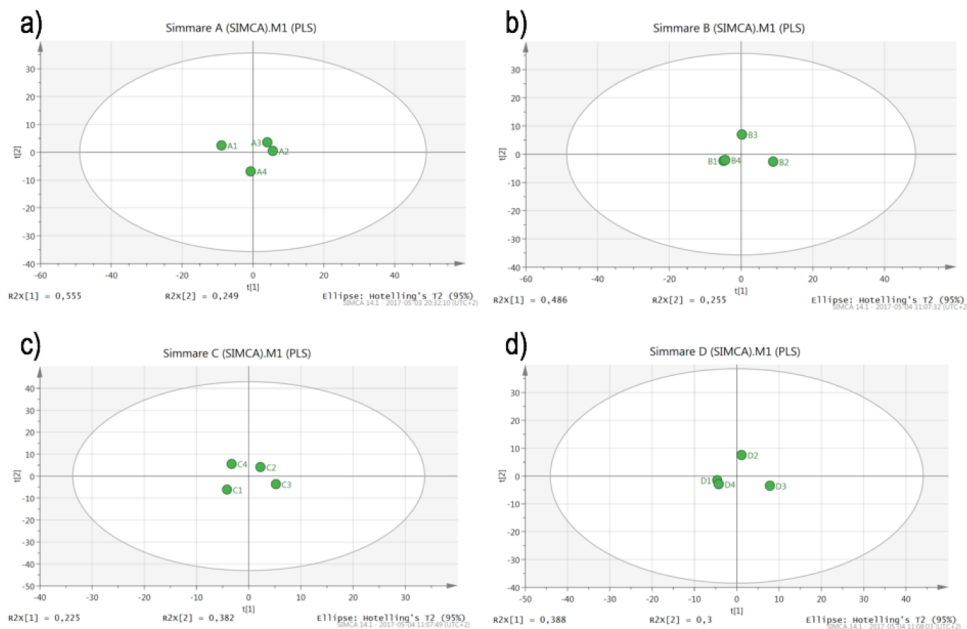
Bilaga 5 – PLS-analyser för samtliga 90 metaboliter

En sammanställning av R^2 - och Q^2 -värden samt antal komponenter för de fyra första PLS-analyserna kan ses i Figur 27.



Figur 27 – R^2 - och Q^2 -värden samt antal komponenter för a) Simmare A, b) Simmare B, c) Simmare C, d) Simmare D.

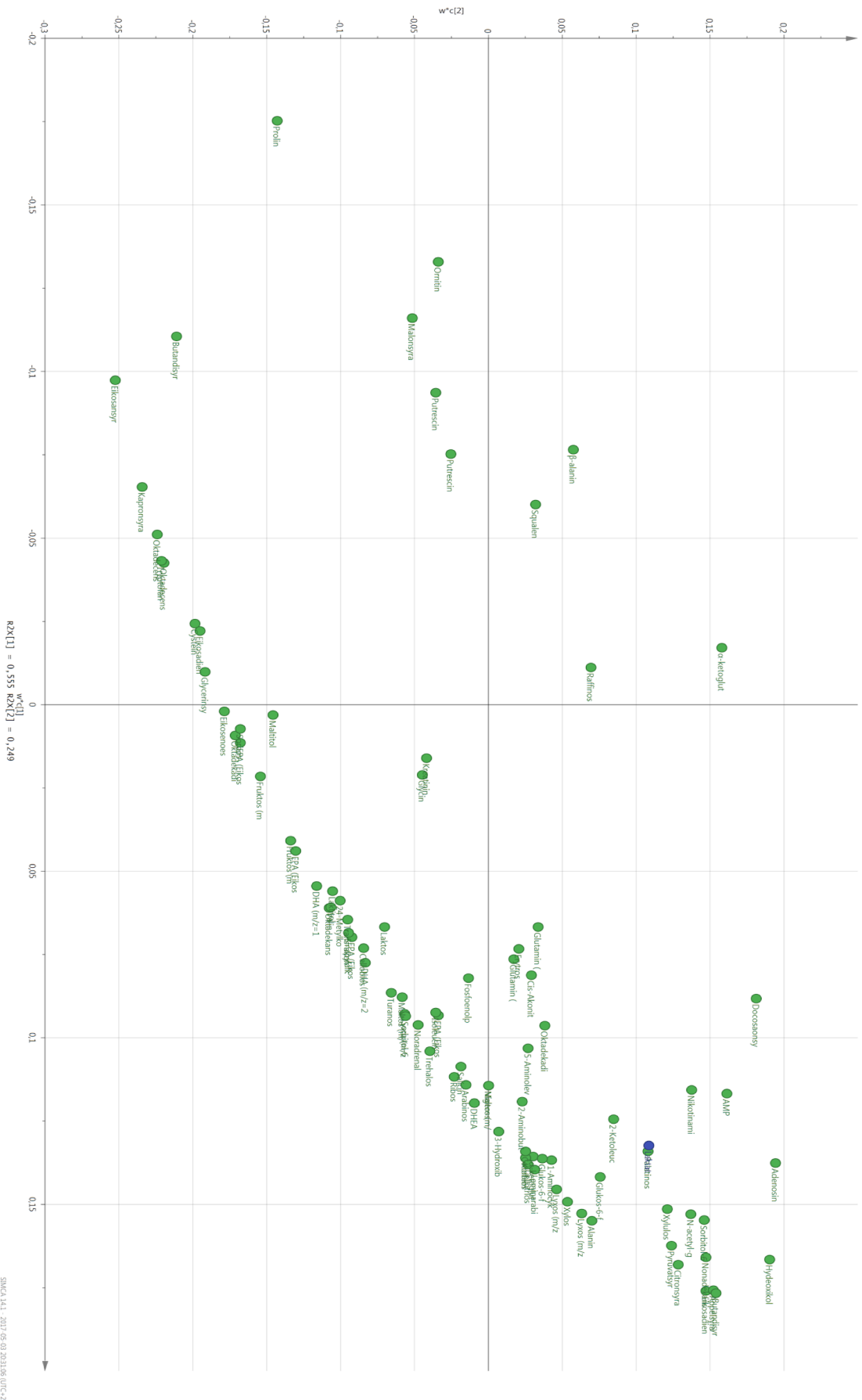
Score plot för de fyra första PLS-analyserna illustreras för respektive simmare i Figur 28. De fyra punkterna, vilka motsvarar prov 1-4, befinner sig på olika ställen i graferna vilket innebär att de innehåller olika metabolitdata.



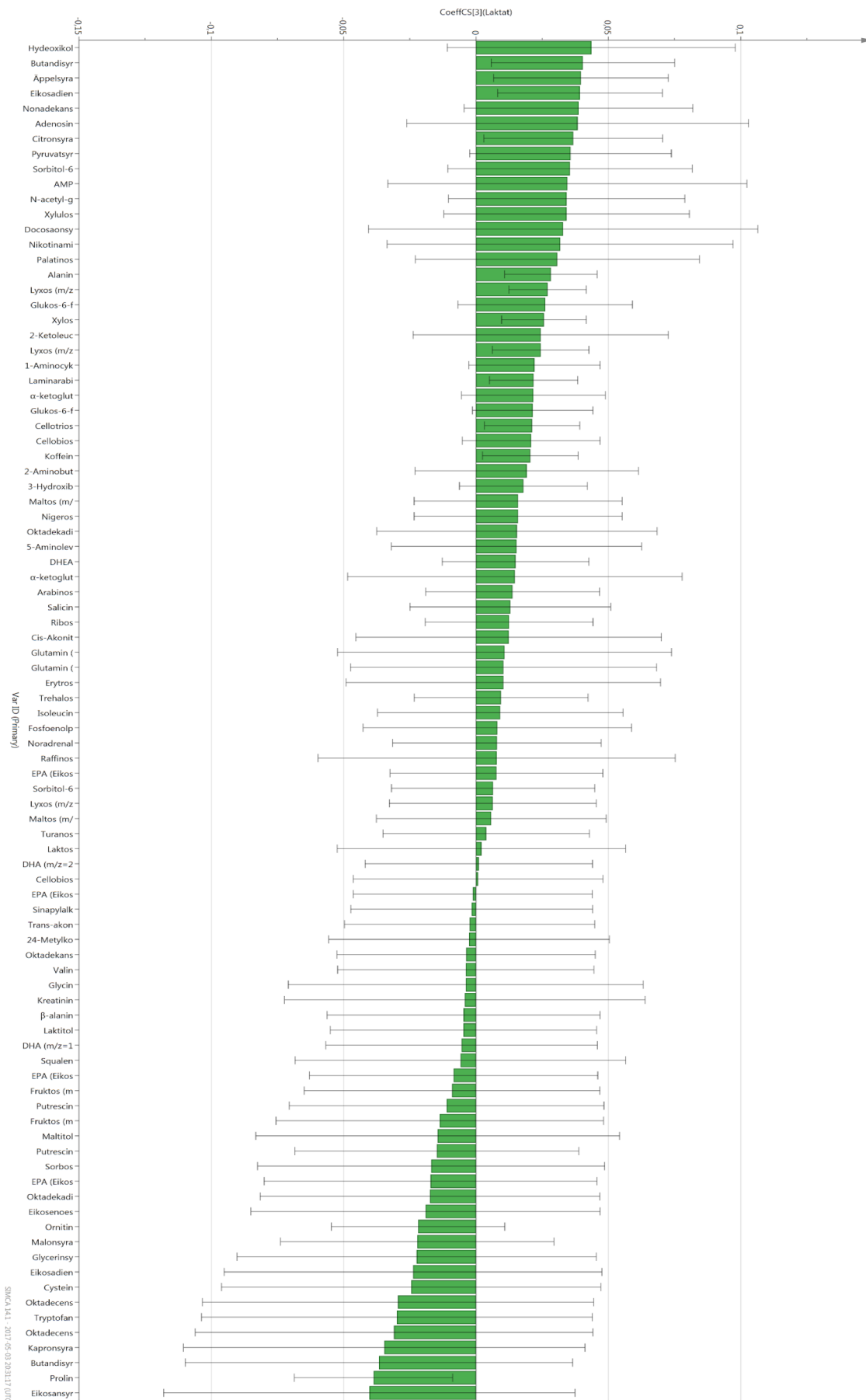
Figur 28 – Score plot för de fyra första PLS-analyserna för a) Simmare A, b) Simmare B, c) Simmare C, d) Simmare D.

I Figurerna 29-36 kan vardera simmares loading plot respektive coefficient plot ses för de fyra första PLS-analyserna.

Simmare A (SIMCA)M1 (P1S)
 Colored according to model terms

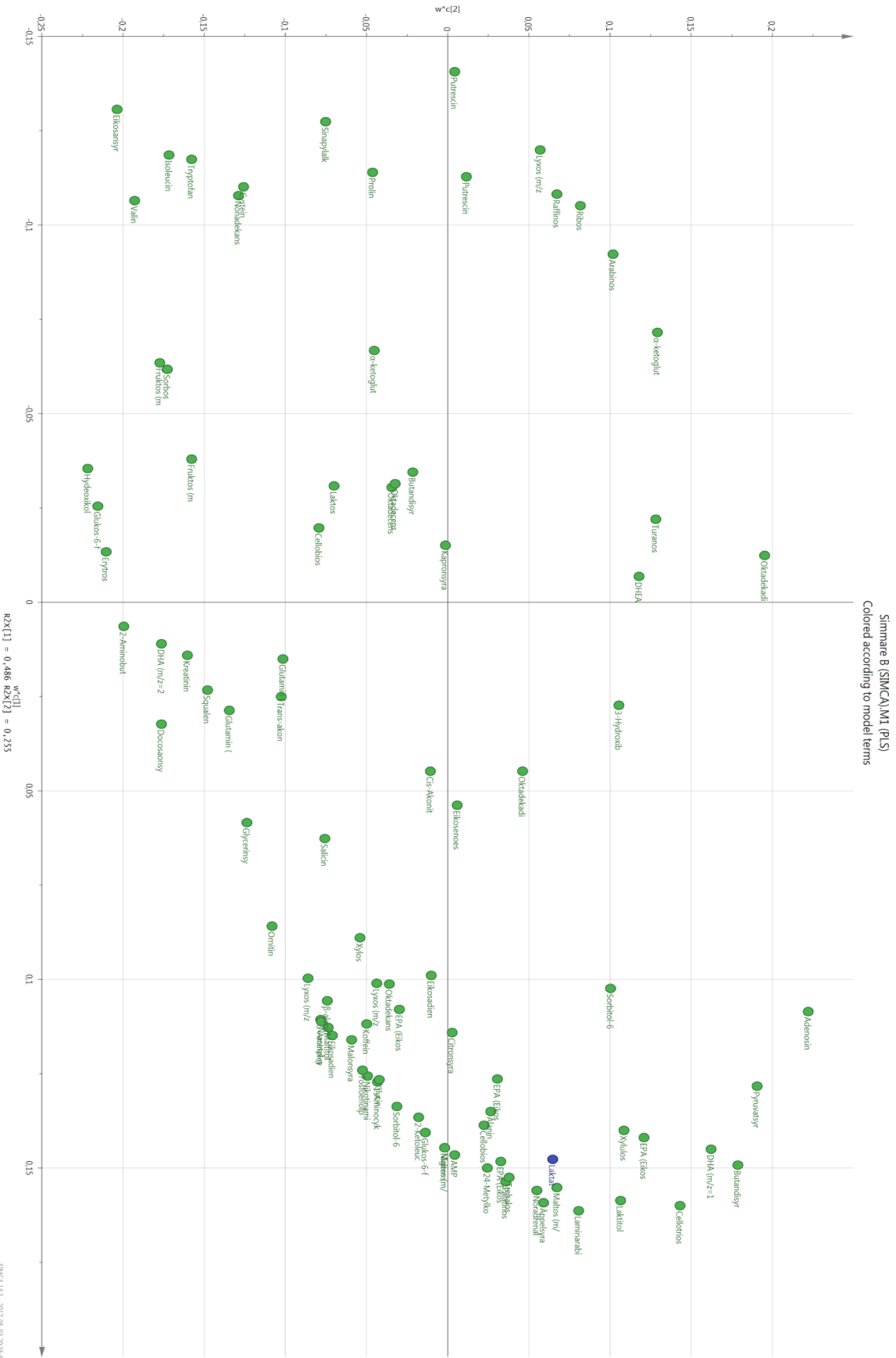


Figur 29 – Loading plot för simmare A.

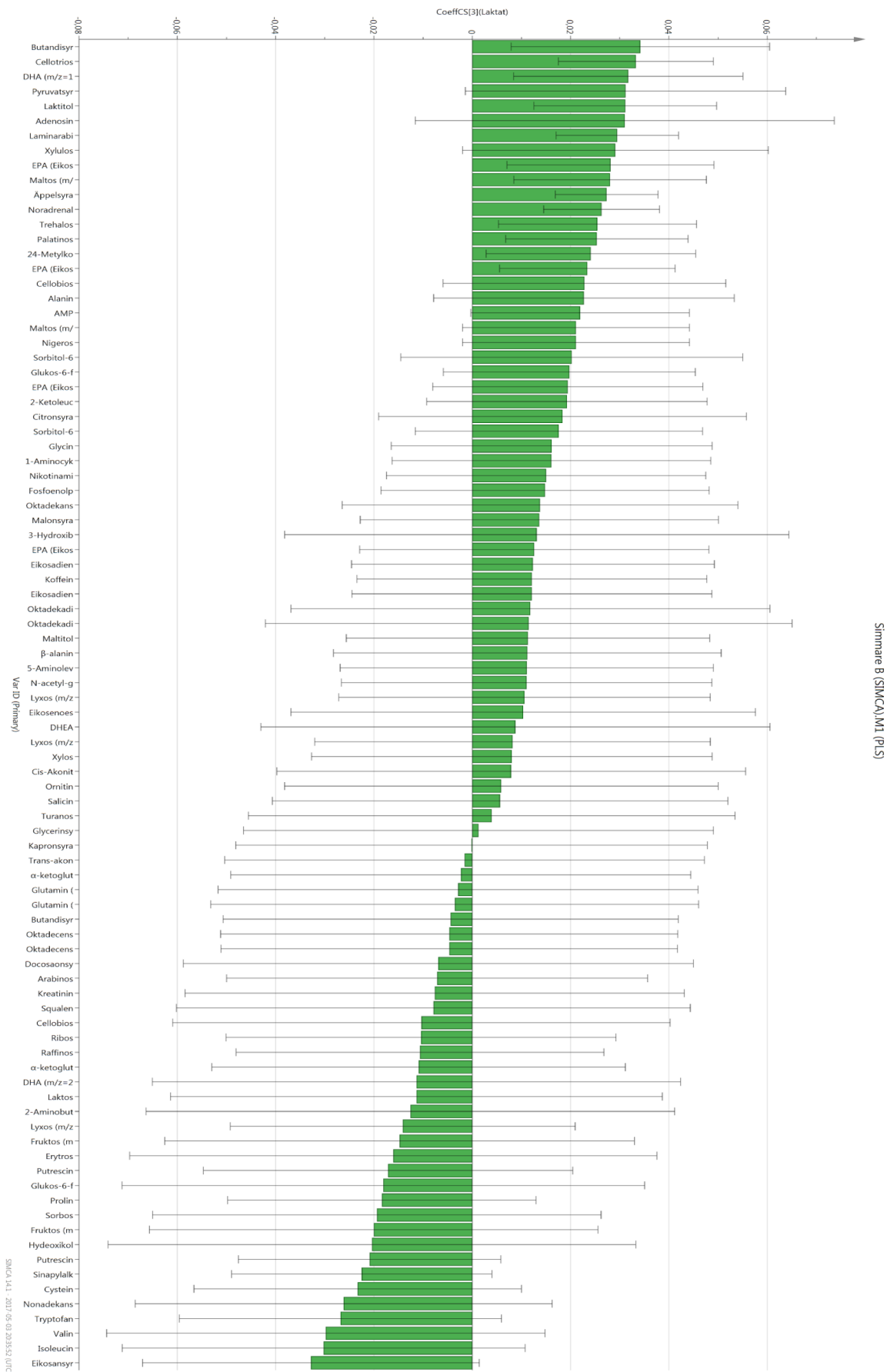


Simmare A (SIMCA1.M1) (PLS)

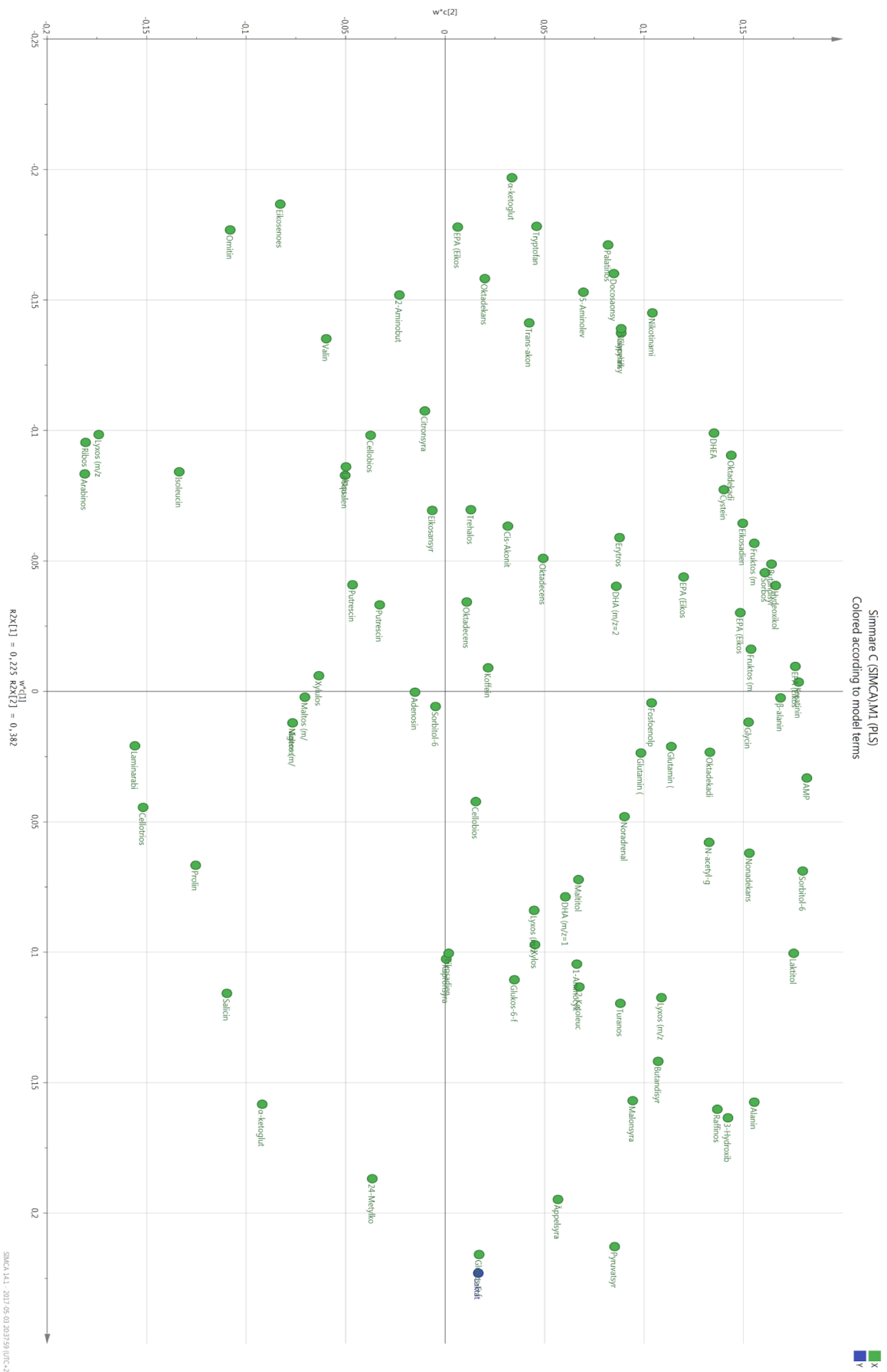
Figur 30 – Coefficient plot för simmare A.



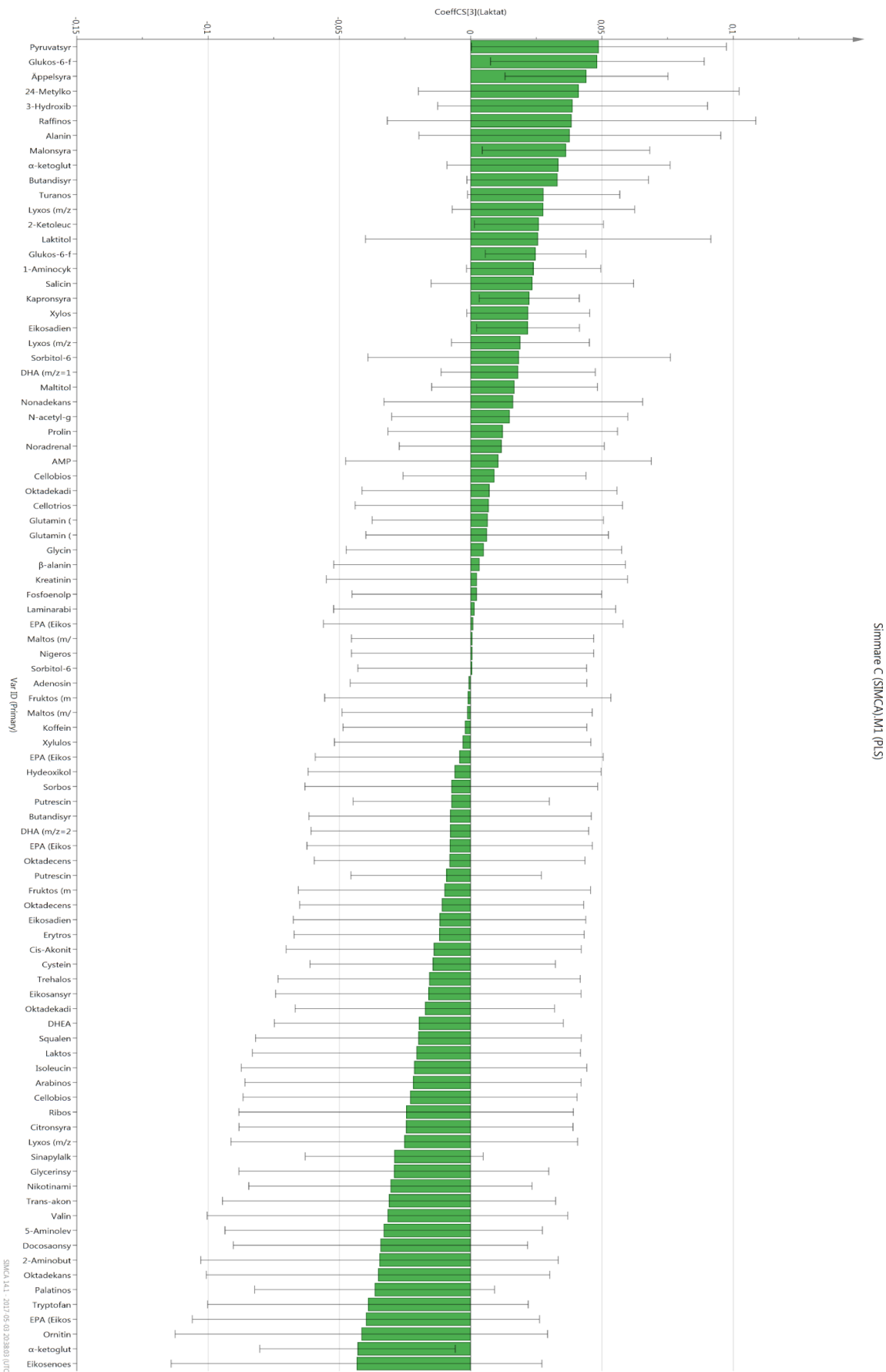
Figur 31 – Loading plot för simmare B.



Figur 32 – Coefficient plot för simmare B.

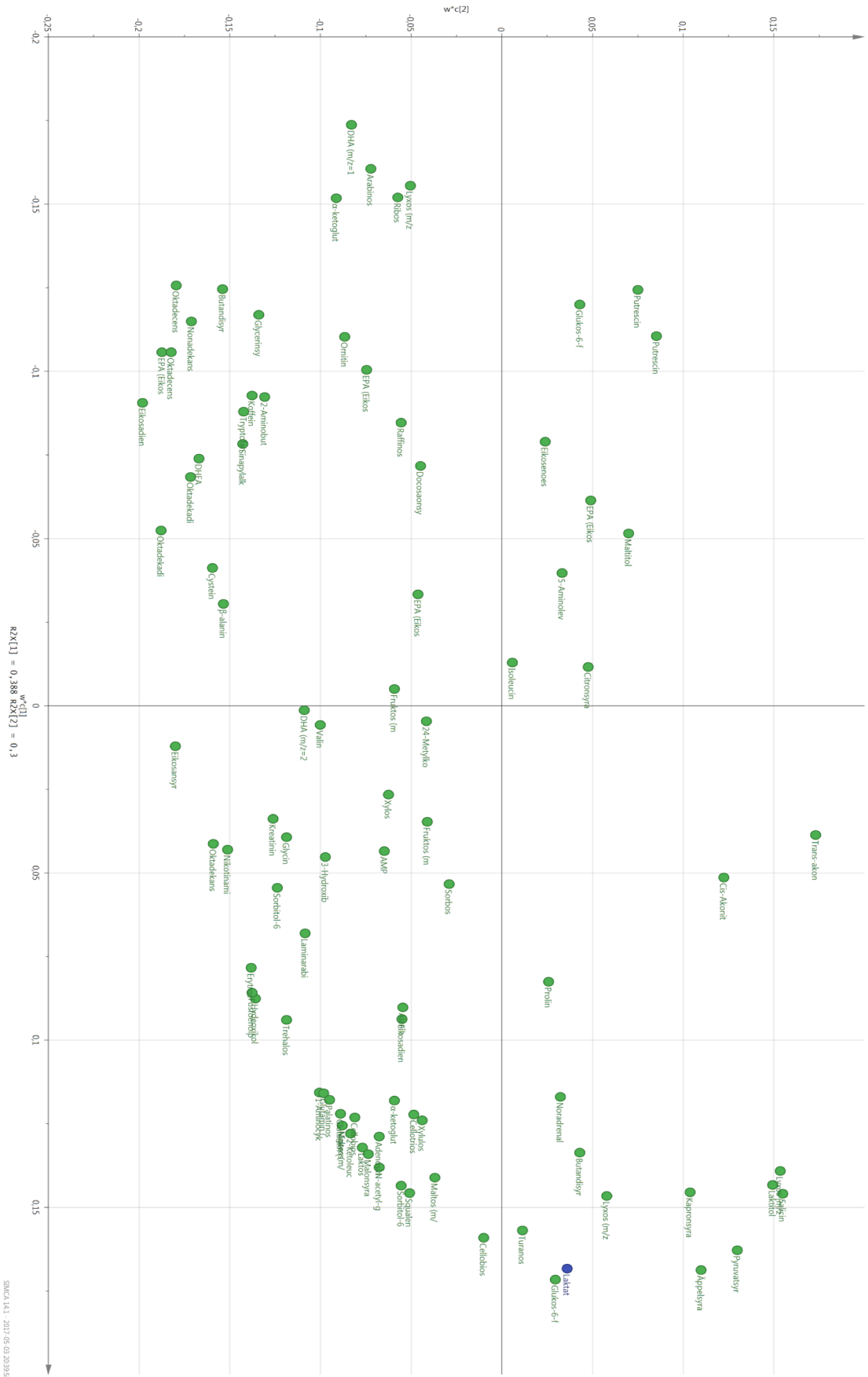


Figur 33 – Loading plot för simmare C.

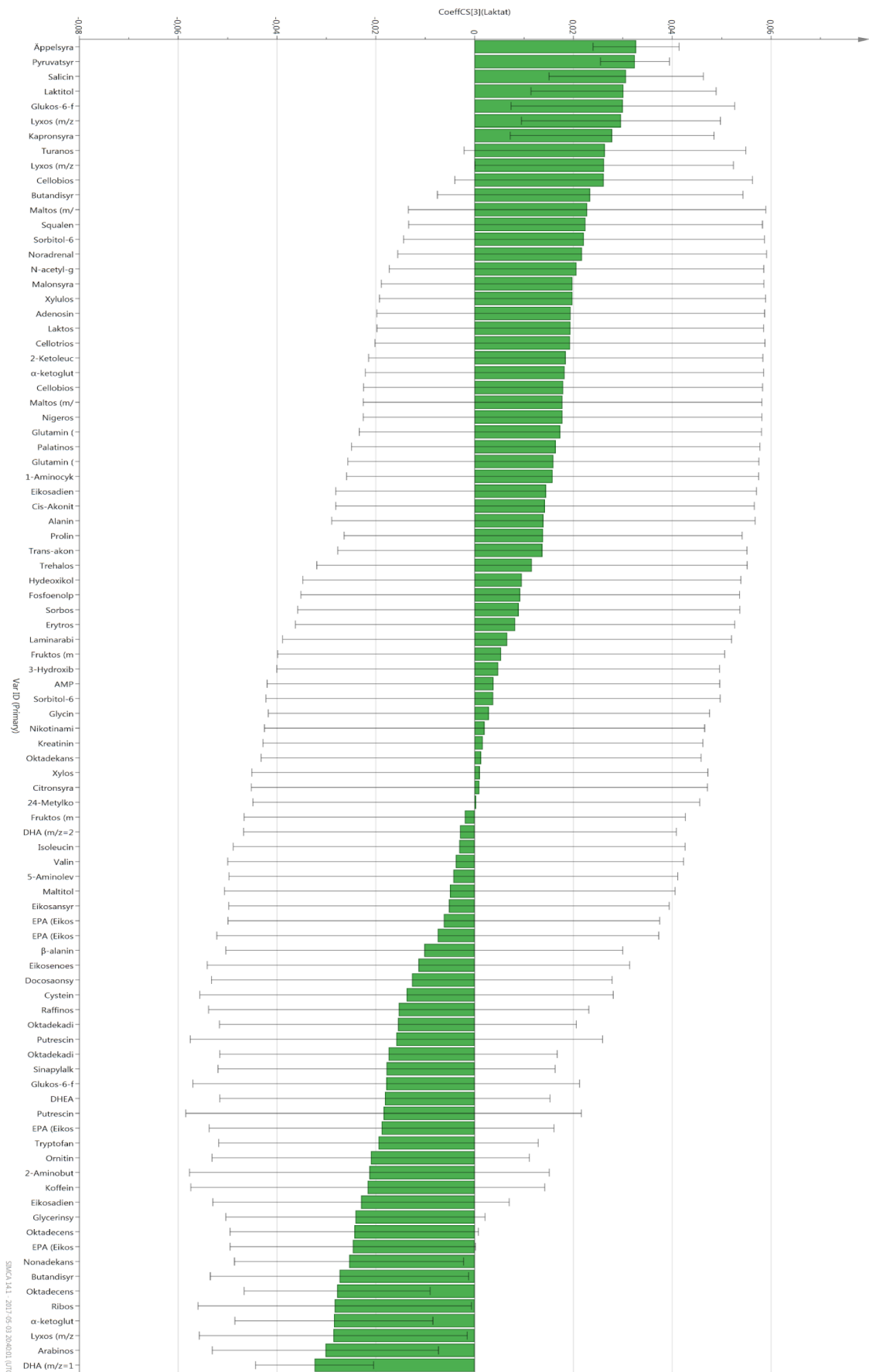


Figur 34 – Coefficient plot för simmare C.

Simmare D (SIMCA)M1 (PLS)
Colored according to model terms



Figur 35 – Loading plot för simmare D.



Simmare D (SIMCAM1 PLS)

Figur 36 – Coefficient plot för simmare D.

Bilaga 6 – Metabolitlista

2-ketoleucin

Ketoleucin är en intermediär vid syntes av aminosyran leucin [50].

3-hydroxibutansyra

3-hydroxibutansyra är en förening vars koncentration ökar i blodet vid svält. Hos människor syntetiseras 3-hydroxybutansyra från acetyl-CoA i levern och används även som energikälla i hjärnan när glukosnivån i blodet är låg. När kroppen utsätts för fysisk ansträngning ökar halten av 3-hydroxibutansyra, vilket resulterar i en ökning av signalproteinet BDNF. BDNF har positiva effekter i hjärnan, bland annat för förbättring av den kognitiva förmågan [51], [52].

AMP

Adenosin-5-monofosfat förkortas AMP och är en nukleotid som finns i RNA. AMP kan produceras vid syntes av ATP och ingår i många av kroppens metabola processer, däribland pyruvatmetabolism och biosyntes av ett flertal aminosyror [53].

Adenosin

Adenosin är en nukleosid som produceras av bland annat hjärnan, hjärtat och skelettmuskulaturen. Nukleosiden består av adenin samt D-ribos och har en halveringstid på 10 sekunder i mänskligt blod. Under fysisk ansträngning bryts ATP ned, vilket resulterar i att halterna av adenosin ökar i blodet [54], [55].

Alanin

Alanin är en icke-essentiell aminosyra som är en viktig energikälla och utsöndras från musklerna. I glukoneogenesen omvandlas alanin till pyruvat som sedan bildar glukos. Denna reaktion kan ske omvänt och är således cyklisk. Alaninmetabolism är beroende av enzym som innehåller vitamin B6. Kött och vegetoroddar är exempel på produkter som innehåller mycket alanin [56], [57].

α -ketoglutarat och α -ketoglutaratsyra

α -ketoglutarat är den joniska formen av α -ketoglutaratsyra och är en av huvudkomponenterna i citronsyracykeln. Jonen är en prekursor till glutamat och glutamin som stimulerar proteinsyntesen, men förbättrar även bildningen av benvävnad i skelettmuskulaturen [S10].

Butandisyra

Butandisyra är en dikarboxylsyra, vars jon kallas succinat och är en komponent i citronsyracykeln där den kan donera elektroner till elektrontransportkedjan. Enzymet succinatdehydrogenas, SDH, spelar en stor roll för den mitokondriella funktionen och genom oxidation av succinat involveras SDH i citronsyracykeln. Där deltar enzymet i nedbrytningen av acetyl-CoA. Butandisyran har på senare tid identifierats som en cancerframkallande metabolit [58].

Cellobios

Cellobios är en disackarid och består därmed av två glukosenheter. Molekylen bildas vid hydrolys av cellulosa och är en produkt vid mikroskopisk nedbrytning av plantor. Cellobios produceras inte i kroppen men kan hittas i olika livsmedel [59].

Cellotrios

Cellotrios är en trisackarid och består av tre glukosenheter. Den bildas, liksom cellobios, vid nedbrytning av cellulosa. Cellobios och cellotrios kan båda brytas ned till glukos [60].

Cystein

Cystein är en icke-essentiell aminosyra som förekommer i de flesta protein, men i små mängder. Aminosyran har förmågan att bilda disulfidbindningar, vilket är betydelsefullt för många proteiners struktur. Cystein är ofta involverad i elektrontransportkedjan och underlättar enzymatiska reaktioner. Dess förmåga att genomgå redoxreaktioner medför antioxidiska egenskaper. Aminosyran är även en viktig metabol svavelkälla och ingår dessutom i vissa medicinska behandlingar [61].

Eikosansyra

Eikosansyra är en mättad fettsyra som finns naturligt i jordnötsolja. Den är olöslig i vatten och stabil under normala förhållanden [62].

Glukos-6-fosfat

Glukos-6-fosfat, förkortat G6P, är den fosforylerade formen av glukos och är en intermediär i glykolysen. När glukos förs in i en cell fosforyleras den direkt till G6P för att förhindra diffusion ut ur cellmembranet. G6P kan även brytas ned i syfte att bilda fettsyror och aminosyror. Förutom de metabola vägarna kan G6P även lagras som glykogen i levern när blodsockernivån är hög [63].

Glycerinsyra

Glycerinsyra är en karboxylsyra som bildas genom oxidation av glycerol [64].

Laktitol

Laktitol är en sockeralkohol och används som sötningsmedel i livsmedel [65].

Lyxos

Lyxos finns inte naturligt i kroppen och är en sockerart som kan framställas från galaktos [66].

N-acetyl-glukosamin

N-acetyl-glukosamin är ett derivat av glukos som finns i bland annat hud samt blodkärl och har förmåga att modifiera kärn- och cytoplasmiska proteiner. Protein modifierade på detta vis är involverade i att känna av näringsstillståndet i cellen och justerar därefter aktiviteten av cellulära proteiner. De modifierade proteinerna har även en hormonreglerande förmåga och en skyddande funktion vid stress [67], [68].

Noradrenalin

Noradrenalin kallas även norepinefrin och är en prekursor till epinefrin som är en viktig neurotransmittor. Noradrenalin ökar kontraktionsförmågan hos skelettmuskulatur och kontraktionshastigheten i hjärtat [69], [70].

Oktadecensyra

Oktadecensyra, även kallad oljesyra, är en enkelomättad fettsyra [71].

Ornitin

Ornitin är en aminosyra som har en central roll i ureacykeln och avlägsnar ammoniak. En studie har visat att effekten av ornitin som kosttillskott motverkar muskeltrötthet och energiomsättningen [72], [73].

Pyruvatsyra

Pyruvatsyra är en intermediär i kolhydrat-, protein- och fettmetabolism. I muskler finns pyruvatsyran i redoxjämvikt med mjölksyra och ingår även som en komponent i bland annat citronsyracykeln, glukoneogenesen och glykolysen. Studier visar att träning i kombination med intag av pyruvatsyra som kosttillskott ökar fettförbränning [74], [75]

Salicin

Salicin är en alkoholglykosid med antiinflammatoriska egenskaper. Salicin, som liknar läkemedlet Aspirin både till kemisk struktur och verkan, bryts ned till acetylsalicylsyra vilket också är den aktiva substansen i Aspirin [76], [77].

Sinapylalkohol

Det finns inte mycket som är känt om sinapylalkohol förutom att det är en organisk förening [78].

Sorbitol-6-fosfat

Sorbitol-6-fosfat är en intermediär i biosyntesen av sockeralkoholen sorbitol, som bland annat inhiberar aktiviteten hos glukos-6-fosfat och fruktos-6-fosfat i cytosolen [79].

Tryptofan

Tryptofan är en essentiell aminosyra och en prekursor till hormonet serotonin. Aminosyran är även en komponent till andra aminosyror [80]. I blodet är tryptofan involverat i immunförsvarets inflammationsprocess. Nivåerna av metaboliten ökar ofta vid kolhydratrika dieter, vilket således ökar serotoninproduktionen. Förhöjda nivåer av serotonin kan inducera slöhet och det finns forskning som tyder på att reducerade serotoninivåer kan förbättra fysisk prestation [81].

Xylulos

Xylitol, som är en sockeralkohol och ett vanligt sötningsmedel, omvandlas till xylulos. Processen sker i röda blodkroppar och förmodligen är xylulos en prekursor till ett flertal andra sockeralkoholer. Trots att dessa föreningar finns hos alla levande organismer, är väldigt lite känt kring deras metabolism. Xylitol hittas i frukt och grönsaker i låga koncentrationer, men kan även tillverkas på syntetisk väg [82], [83].

Äppelsyra

Äppelsyra är en dikarboxylsyra och kan bildas från pyruvat. Syran främjar aerob metabolism och finns i många frukter såsom äpple, tomat och plommon [84], [85]. I joniserad form kallas äppelsyra för malat, vilket är en betydande intermediär i citronsyracykeln. Malat är en viktig komponent för transport av NADH från cytosol till mitokondrier samt vid produktion av ATP. Jonen har därför flera fysiologiska funktioner såsom att motverka trötthet, skydda hjärtat och förbättra respiration i mitokondrier. Studier har visat på att tillsatser av malat ökar prestationsförmågan och bidrar till att upprätthålla en hög glukoskoncentration under träning. Dessutom ökar reduceringshastigheten av laktat i blodet och tröttheten fördröjs. Äppelsyratillskott kan reglera nivån av energimetabolism, förbättra hjärtfunktion och minska trötthet under fysisk ansträngning [86].

Bilaga 7 – Koefficientsummor för samtliga 90 metaboliter

Koefficienter samt koefficientsummor för samtliga 90 metaboliter presenteras i Tabell 2. Alla signifikanta metaboliter, vars absolutbelopp av koefficientsumman överstiger 0,07 markeras i rött. Observera att α -ketoglutarat och noradrenalin inkluderats även om absolutbeloppet av koefficientsumman inte överstiger 0,07. Notera även att båda fragmenten för oktadecensyra har en signifikant koefficientsumma, men endast ett av fragmenten har inkluderats. Detta beror på att summorna är så pass lika att ett av fragmenten valdes att uteslutas.

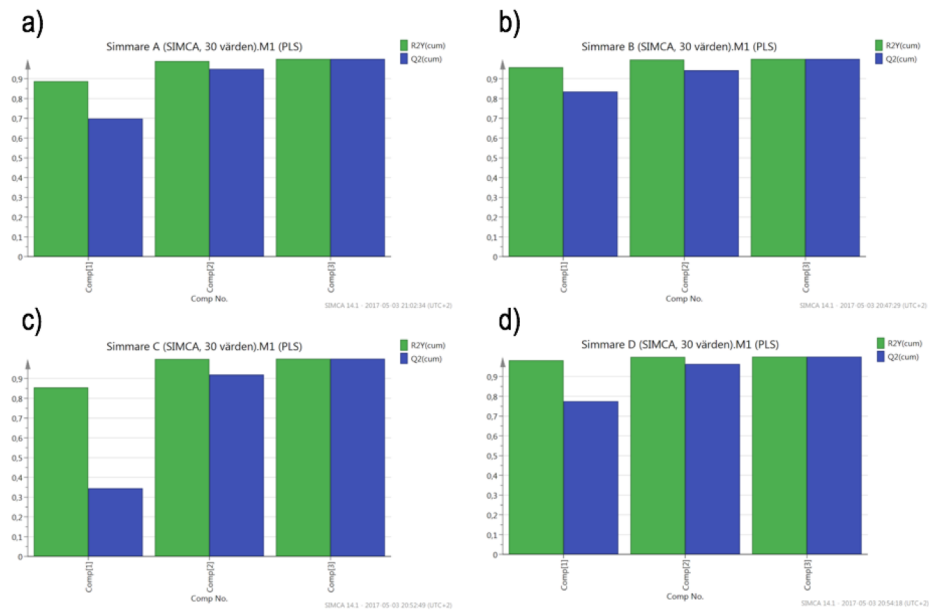
Tabell 2 – Koefficienter och koefficientsummor för samtliga metaboliter.

Metabolit	Simmare A	Simmare B	Simmare C	Simmare D	Summa
<i>1-aminocyklopropan-karboxylsyra</i>	0,022092	0,016088	0,024011	0,015776	0,077966
<i>24-metylkolesterol</i>	-0,00264	0,024126	0,041175	0,000332	0,062989
<i>2-aminobutansyra</i>	0,019169	-0,0126	-0,03473	-0,02131	-0,04947
<i>2-ketoleucin</i>	0,024466	0,019264	0,026001	0,018442	0,088173
<i>3-hydroxibutansyra</i>	0,017902	0,013129	0,03882	0,004767	0,074618
<i>5-aminolevulinsyra</i>	0,015291	0,011094	-0,03313	-0,00431	-0,01105
<i>Cis-akonitsyra</i>	0,012342	0,007917	-0,01408	0,014239	0,020422
<i>Trans-akonitsyra</i>	-0,00241	-0,00157	-0,03111	0,013716	-0,02137
<i>AMP</i>	0,034496	0,021937	0,01059	0,003804	0,070827
<i>Adenosin</i>	0,038409	0,031023	-0,0008	0,019452	0,088079
<i>Alanin</i>	0,028283	0,022715	0,037788	0,013932	0,102718
<i>α-ketoglutarat</i>	0,014663	-0,01092	-0,04307	-0,02848	-0,06781
<i>α-ketoglutaratsyra</i>	0,021684	-0,00233	0,033468	0,018194	0,071015
<i>Arabinos</i>	0,013831	-0,00715	-0,02197	-0,03021	-0,0455
<i>β-alanin</i>	-0,00471	0,011206	0,003426	-0,01019	-0,00027
<i>Koffein</i>	0,02052	0,012139	-0,0022	-0,02164	0,008823
<i>Cellobios (m/z=361)</i>	0,000806	-0,01035	-0,02308	0,026126	-0,0065
<i>Cellobios (m/z=205)</i>	0,020844	0,022827	0,009095	0,017912	0,070678
<i>Cellotrios</i>	0,021191	0,033291	0,006899	0,019317	0,080698
<i>Citronsyra</i>	0,036729	0,018366	-0,02464	0,00098	0,031435
<i>Kreatinin</i>	-0,00423	-0,00764	0,002399	0,001669	-0,00781
<i>Cystein</i>	-0,02452	-0,02331	-0,01448	-0,01377	-0,07608
<i>DHEA</i>	0,014941	0,008774	-0,01977	-0,01816	-0,01422
<i>DHA (m/z=224)</i>	0,001052	-0,01135	-0,00792	-0,00297	-0,02119
<i>DHA (m/z=175)</i>	-0,00545	0,03173	0,01809	-0,0324	0,011966
<i>Docosaonsyra-metylester</i>	0,032899	-0,00692	-0,03433	-0,01271	-0,02106
<i>Kapronsyra</i>	-0,03466	-0,00016	0,022313	0,027844	0,015338
<i>Eikosadiensyra</i>	-0,02381	0,012344	-0,01185	-0,02299	-0,0463
<i>Eikosadiensyra-metylester</i>	0,039289	0,012131	0,021873	0,014468	0,08776
<i>Eikosansyra</i>	-0,04034	-0,03283	-0,01617	-0,0052	-0,09453
<i>EPA (Eikosapentaensyra) (m/z=137)</i>	-0,01719	0,028117	-0,00433	-0,00747	-0,00087
<i>EPA (Eikosapentaensyra) (m/z=201)</i>	0,007736	0,023405	-0,00798	-0,01882	0,004332
<i>EPA (Eikosatetraensyra) (m/z=203)</i>	-0,00121	0,019434	0,000994	-0,02465	-0,00543
<i>EPA (Eikosatetraensyra) (m/z=137)</i>	-0,00846	0,012606	-0,03991	-0,00624	-0,042
<i>Eikosenoesyra</i>	-0,01909	0,010353	-0,04343	-0,01137	-0,06355
<i>Erytros</i>	0,010321	-0,01606	-0,012	0,008191	-0,00955
<i>Fruktos (m/z=334)</i>	-0,00906	-0,01478	-0,00109	-0,002	-0,02694
<i>Fruktos (m/z=172)</i>	-0,0137	-0,02005	-0,01	0,005357	-0,03839
<i>Glukos-6-fosfat (m/z=471)</i>	0,026145	0,019744	0,02475	0,030009	0,100648
<i>Glukos-6-fosfat (m/z=195)</i>	0,021416	-0,0181	0,048249	-0,01791	0,033664
<i>Glutamin (m/z=157)</i>	0,010405	-0,00357	0,006537	0,017357	0,030726
<i>Glutamin (m/z=155)</i>	0,010772	-0,00288	0,006278	0,015956	0,03012
<i>Glycerinsyra</i>	-0,02242	0,001265	-0,02926	-0,02411	-0,07452
<i>Glycin</i>	-0,00388	0,016157	0,005063	0,002897	0,02024

<i>Hydeoxikoliksiyra</i>	0,043556	-0,02042	-0,00614	0,009548	0,026545
<i>Isoleucin</i>	0,009155	-0,03024	-0,02157	-0,00312	-0,04577
<i>Laktitol</i>	-0,00477	0,03113	0,025712	0,030148	0,082223
<i>Laktos</i>	0,002049	-0,01136	-0,02064	0,019368	-0,01058
<i>Laminarabinos</i>	0,021756	0,029498	0,001522	0,006583	0,059358
<i>Lyxos (m/z=217)</i>	0,024423	0,010641	0,018943	0,026227	0,080234
<i>Lyxos (m/z=104)</i>	0,027029	0,008195	0,027709	0,02962	0,092554
<i>Lyxos (m/z=308)</i>	0,006358	-0,01414	-0,02528	-0,02861	-0,06167
<i>Äppelsyra</i>	0,039676	0,02734	0,044134	0,032683	0,143832
<i>Malonsyra</i>	-0,02221	0,013635	0,036311	0,019836	0,047567
<i>Maltitol</i>	-0,01449	0,011339	0,016734	-0,00503	0,008561
<i>Maltos (m/z=363)</i>	0,005767	0,028033	-0,00134	0,02276	0,05522
<i>Maltos (m/z=362)</i>	0,015906	0,021095	0,000738	0,017793	0,055532
<i>N-acetyl-glukosamin</i>	0,034248	0,011067	0,014886	0,020621	0,080821
<i>Nikotinamid</i>	0,031776	0,015037	-0,03058	0,002008	0,018244
<i>Nigeros</i>	0,015906	0,021095	0,000738	0,017793	0,055532
<i>Nonadekansyra</i>	0,038728	-0,02616	0,016235	-0,02542	0,003382
<i>Noradrenalin</i>	0,007909	0,026294	0,011828	0,021764	0,067795
<i>Oktadekadiensyra</i>	-0,01741	0,011828	0,007188	-0,01551	-0,0139
<i>Oktadekadiensyra-metylester</i>	0,015448	0,011466	-0,01746	-0,01743	-0,00798
<i>Oktadekansyra</i>	-0,00372	0,013802	-0,03529	0,001311	-0,0239
<i>Oktadecensyra (m/z=185)</i>	-0,03099	-0,00468	-0,01103	-0,02436	-0,07107
<i>Oktadecensyra (m/z=199)</i>	-0,02948	-0,00469	-0,00805	-0,02783	-0,07004
<i>Ornitiin</i>	-0,02189	0,005914	-0,04165	-0,02102	-0,07865
<i>Palatinos</i>	0,030749	0,025355	-0,03658	0,016409	0,035936
<i>Fosfoenolpyruvatsyra</i>	0,008063	0,014812	0,002354	0,009248	0,034476
<i>Prolin</i>	-0,03873	-0,01839	0,012233	0,013859	-0,03103
<i>Putrescin (m/z=217)</i>	-0,01113	-0,02089	-0,00742	-0,01842	-0,05786
<i>Putrescin (m/z=380)</i>	-0,0148	-0,01714	-0,00933	-0,01584	-0,05711
<i>Pyruvatsyra</i>	0,035707	0,031181	0,048842	0,032439	0,148169
<i>Raffinos</i>	0,007813	-0,01063	0,038437	-0,01535	0,02027
<i>Ribos</i>	0,012518	-0,01042	-0,02459	-0,02832	-0,05081
<i>Salicin</i>	0,01296	0,005661	0,023526	0,030677	0,072824
<i>Sinapylalkohol</i>	-0,00163	-0,02249	-0,02912	-0,01784	-0,07107
<i>Sorbitol-6-fosfat (m/z=255)</i>	0,006476	0,020243	0,01846	0,003738	0,048917
<i>Sorbitol-6-fosfat (m/z=315)</i>	0,035516	0,017631	0,000583	0,022132	0,075862
<i>Sorbos</i>	-0,01696	-0,01941	-0,0074	0,008936	-0,03483
<i>Squalen</i>	-0,0059	-0,00791	-0,01993	0,022454	-0,01129
<i>Butandisyra (m/z=247)</i>	0,040407	0,034184	0,033155	0,023383	0,131129
<i>Butandisyra (m/z=77)</i>	-0,03667	-0,00441	-0,00783	-0,02735	-0,07626
<i>Trehalos</i>	0,009475	0,025476	-0,01584	0,011613	0,030723
<i>Tryptofan</i>	-0,02988	-0,02683	-0,03912	-0,01947	-0,11528
<i>Turanos</i>	0,003871	0,003955	0,02782	0,026381	0,062028
<i>Valin</i>	-0,00387	-0,0298	-0,03168	-0,00383	-0,06919
<i>Xylos</i>	0,025659	0,008048	0,021927	0,001046	0,056679
<i>Xylulos</i>	0,034245	0,029126	-0,00305	0,019809	0,08013

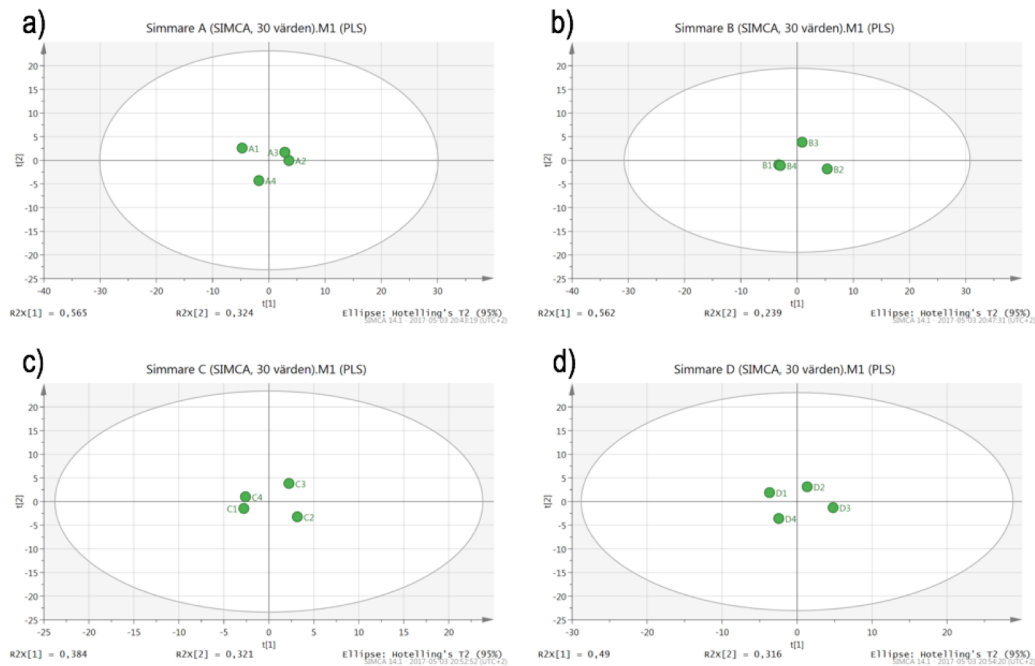
Bilaga 8 – PLS-analyser för de signifikanta metaboliterna

En sammanställning av R^2 - och Q^2 -värden samt antal komponenter för samtliga PLS-analyser på de signifikanta metaboliterna för respektive simmare kan ses i Figur 37.



Figur 37 – R^2 - och Q^2 -värden samt antal komponenter för a) Simmare A, b) Simmare B, c) Simmare C, d) Simmare D.

Samtliga Score plots för PLS-analyserna på de signifikanta metaboliterna för respektive simmare illustreras i Figur 38. De fyra punkterna, vilka motsvarar prov 1-4, befinner sig på olika ställen i graferna vilket innebär att de innehåller olika metabolitdata.



Figur 38 – Score plot för a) Simmare A, b) Simmare B, c) Simmare C, d) Simmare D.