

Effect of repeated freeze-thaw cycles on NMR measured lipoproteins and metabolites in biofluids

Feng Wang^{1, ‡}, Julia Debik^{1, ‡}, Trygve Andreassen², Leslie R. Euceda^{1, 3}, Tonje H. Haukaas^{1, 4}, Claire Cannet⁵, Hartmut Schäfer⁵, Tone F. Bathen^{1, ‡, *}, Guro F. Giskeødegård^{1, ‡, *}

¹ Department of Circulation and Medical Imaging, Faculty of Medicine and Health Sciences, Norwegian University of Science and Technology (NTNU), 7491, Trondheim, Norway.

² MR Core Facility, Department of Circulation and Medical Imaging, Faculty of Medicine and Health Sciences, Norwegian University of Science and Technology (NTNU), 7491, Trondheim, Norway.

³ Camo Analytics, Oslo Science Park, Gaustadalléen 21, 0349, Oslo, Norway.

⁴ SINTEF Industry, Richard Birkelands vei 3, 7034, Trondheim, Norway.

⁵ Bruker Biospin GmbH, Silberstreifen, 76287 Rheinstetten, Germany.

‡ Equal contributions

* Authors for correspondence

Tone F. Bathen, tone.f.bathen@ntnu.no;

Guro F. Giskeødegård, guro.giskeodegard@ntnu.no

SUPPORTING INFORMATION

Table of contents

1	Figure S1. Intraclass correlation coefficients for lipoproteins (A), serum (B) and urine (C) metabolites.....	S-3
2	Table S1, List of measured lipoprotein parameters.....	S-4
3	Table S2, List of measured serum metabolites.....	S-7
4	Table S3, List of measured urine metabolites.....	S-8
5	Table S4, Effects of FTCs on lipoprotein parameter concentrations.....	S-9
6	Table S5, Effects of FTCs on serum metabolite concentrations.....	S-14
7	Table S6, Effects of FTCs on urine metabolite concentrations.....	S-15

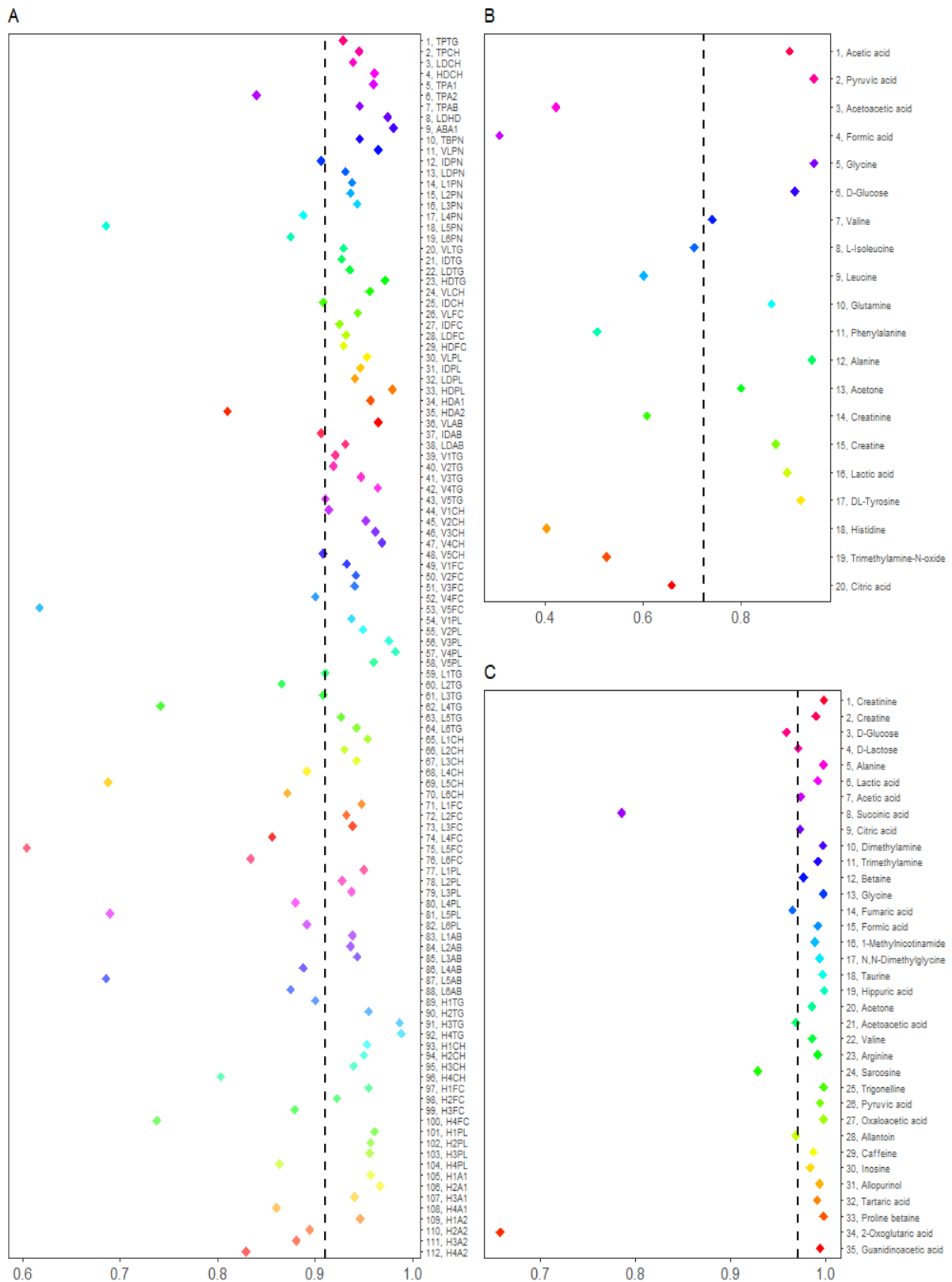


Figure S1. Intraclass correlation coefficients for lipoproteins (A), serum (B) and urine (C) metabolites. The dotted line represents the mean of ICCs across all lipoprotein parameters, all serum metabolites and all urine metabolites, respectively.

Table S1. List of measured lipoprotein parameters

Number	Lipoprotein parameter	Matrix	Measured (or cacluated) Analyte	Unit
1	TPTG	Total Serum	Triglycerides	mg/dL
2	TPCH	Total Serum	Cholesterol	mg/dL
3	LDCH	LDL	Cholesterol	mg/dL
4	HDCH	HDL	Cholesterol	mg/dL
5	TPA1	Total Serum	Apo-A1	mg/dL
6	TPA2	Total Serum	Apo-A2	mg/dL
7	TPAB	Total Serum	Apo-B	mg/dL
8	LDHD*	LDL/HDL	LDL-Chol/HDL-Chol	-/-
9	ABA1*	Apo-B/Apo-A1	Apo-B/Apo-A1	-/-
10	TBPN*	Total Serum	Particle Number	nmol/L
11	VLPN*	VLDL	Particle Number	nmol/L
12	IDPN*	IDL	Particle Number	nmol/L
13	LDPN*	LDL	Particle Number	nmol/L
14	L1PN*	LDL-1	Particle Number	nmol/L
15	L2PN*	LDL-2	Particle Number	nmol/L
16	L3PN*	LDL-3	Particle Number	nmol/L
17	L4PN*	LDL-4	Particle Number	nmol/L
18	L5PN*	LDL-5	Particle Number	nmol/L
19	L6PN*	LDL-6	Particle Number	nmol/L
20	VLTG	VLDL	Triglycerides	mg/dL
21	IDTG	IDL	Triglycerides	mg/dL
22	LDTG	LDL	Triglycerides	mg/dL
23	HDTG	HDL	Triglycerides	mg/dL
24	VLCH	VLDL	Cholesterol	mg/dL
25	IDCH	IDL	Cholesterol	mg/dL
26	VLFC	VLDL	Free Cholesterol	mg/dL
27	IDFC	IDL	Free Cholesterol	mg/dL
28	LDFC	LDL	Free Cholesterol	mg/dL
29	HDFC	HDL	Free Cholesterol	mg/dL
30	VLPL	VLDL	Phospholipids	mg/dL
31	IDPL	IDL	Phospholipids	mg/dL
32	LDPL	LDL	Phospholipids	mg/dL
33	HDPL	HDL	Phospholipids	mg/dL
34	HDA1	HDL	Apo-A1	mg/dL
35	HDA2	HDL	Apo-A2	mg/dL
36	VLAB	VLDL	Apo-B	mg/dL
37	IDAB	IDL	Apo-B	mg/dL
38	LDAB	LDL	Apo-B	mg/dL
39	V1TG	VLDL-1	Triglycerides	mg/dL
40	V2TG	VLDL-2	Triglycerides	mg/dL
41	V3TG	VLDL-3	Triglycerides	mg/dL
42	V4TG	VLDL-4	Triglycerides	mg/dL
43	V5TG	VLDL-5	Triglycerides	mg/dL

44	V1CH	VLDL-1	Cholesterol	mg/dL
45	V2CH	VLDL-2	Cholesterol	mg/dL
46	V3CH	VLDL-3	Cholesterol	mg/dL
47	V4CH	VLDL-4	Cholesterol	mg/dL
48	V5CH	VLDL-5	Cholesterol	mg/dL
49	V1FC	VLDL-1	Free Cholesterol	mg/dL
50	V2FC	VLDL-2	Free Cholesterol	mg/dL
51	V3FC	VLDL-3	Free Cholesterol	mg/dL
52	V4FC	VLDL-4	Free Cholesterol	mg/dL
53	V5FC	VLDL-5	Free Cholesterol	mg/dL
54	V1PL	VLDL-1	Phospholipids	mg/dL
55	V2PL	VLDL-2	Phospholipids	mg/dL
56	V3PL	VLDL-3	Phospholipids	mg/dL
57	V4PL	VLDL-4	Phospholipids	mg/dL
58	V5PL	VLDL-5	Phospholipids	mg/dL
59	L1TG	LDL-1	Triglycerides	mg/dL
60	L2TG	LDL-2	Triglycerides	mg/dL
61	L3TG	LDL-3	Triglycerides	mg/dL
62	L4TG	LDL-4	Triglycerides	mg/dL
63	L5TG	LDL-5	Triglycerides	mg/dL
64	L6TG	LDL-6	Triglycerides	mg/dL
65	L1CH	LDL-1	Cholesterol	mg/dL
66	L2CH	LDL-2	Cholesterol	mg/dL
67	L3CH	LDL-3	Cholesterol	mg/dL
68	L4CH	LDL-4	Cholesterol	mg/dL
69	L5CH	LDL-5	Cholesterol	mg/dL
70	L6CH	LDL-6	Cholesterol	mg/dL
71	L1FC	LDL-1	Free Cholesterol	mg/dL
72	L2FC	LDL-2	Free Cholesterol	mg/dL
73	L3FC	LDL-3	Free Cholesterol	mg/dL
74	L4FC	LDL-4	Free Cholesterol	mg/dL
75	L5FC	LDL-5	Free Cholesterol	mg/dL
76	L6FC	LDL-6	Free Cholesterol	mg/dL
77	L1PL	LDL-1	Phospholipids	mg/dL
78	L2PL	LDL-2	Phospholipids	mg/dL
79	L3PL	LDL-3	Phospholipids	mg/dL
80	L4PL	LDL-4	Phospholipids	mg/dL
81	L5PL	LDL-5	Phospholipids	mg/dL
82	L6PL	LDL-6	Phospholipids	mg/dL
83	L1AB	LDL-1	Apo-B	mg/dL
84	L2AB	LDL-2	Apo-B	mg/dL
85	L3AB	LDL-3	Apo-B	mg/dL
86	L4AB	LDL-4	Apo-B	mg/dL
87	L5AB	LDL-5	Apo-B	mg/dL
88	L6AB	LDL-6	Apo-B	mg/dL

89	H1TG	HDL-1	Triglycerides	mg/dL
90	H2TG	HDL-2	Triglycerides	mg/dL
91	H3TG	HDL-3	Triglycerides	mg/dL
92	H4TG	HDL-4	Triglycerides	mg/dL
93	H1CH	HDL-1	Cholesterol	mg/dL
94	H2CH	HDL-2	Cholesterol	mg/dL
95	H3CH	HDL-3	Cholesterol	mg/dL
96	H4CH	HDL-4	Cholesterol	mg/dL
97	H1FC	HDL-1	Free Cholesterol	mg/dL
98	H2FC	HDL-2	Free Cholesterol	mg/dL
99	H3FC	HDL-3	Free Cholesterol	mg/dL
100	H4FC	HDL-4	Free Cholesterol	mg/dL
101	H1PL	HDL-1	Phospholipids	mg/dL
102	H2PL	HDL-2	Phospholipids	mg/dL
103	H3PL	HDL-3	Phospholipids	mg/dL
104	H4PL	HDL-4	Phospholipids	mg/dL
105	H1A1	HDL-1	Apo-A1	mg/dL
106	H2A1	HDL-2	Apo-A1	mg/dL
107	H3A1	HDL-3	Apo-A1	mg/dL
108	H4A1	HDL-4	Apo-A1	mg/dL
109	H1A2	HDL-1	Apo-A2	mg/dL
110	H2A2	HDL-2	Apo-A2	mg/dL
111	H3A2	HDL-3	Apo-A2	mg/dL
112	H4A2	HDL-4	Apo-A2	mg/dL

Density ranges for lipoprotein main fractions: VLDL: 0.950-1.006 kg/L, IDL: 1.006-1.019 kg/L, LDL: 1.019-1.063 kg/L and HDL: 1.063-1.210 kg/L.

Density ranges for lipoprotein subfractions: LDL1: 1.019-1.031 kg/L, LDL2: 1.031-1.034 kg/L, LDL3: 1.034-1.037 kg/L, LDL4: 1.037-1.040 kg/L, LDL5: 1.040-1.044 kg/L, and LDL6: 1.044-1.063 kg/L. HDL1: 1.063-1.100 kg/L, HDL2: 1.100-1.112 kg/L, HDL3: 1.112-1.125 kg/L, and HDL4: 1.125-1.210 kg/L. Properties of VLDL subfractions are specified in the following reference: Lindgren FT, Jensen LL, Hatch FT (1972) The isolation and quantitative analysis of serum lipoproteins. In Nelson GJ (ed.) Blood lipids and lipoproteins: Quantitation, composition and metabolism. Wiley-Interscience, New York, p 181-274.

Numbers for lipoprotein parameters are corresponding to those used in **Figure 2**.

* : Calculated from the original ones.

Table S2. List of measured serum metabolites

Quantified	Not quantifiable
Acetic acid	Ethanol
Pyruvic acid	3-Hydroxybutyric acid
Acetoacetic acid	Glycerol
Formic acid	Glutamic acid
Glycine	Ca-EDTA*
D-Glucose	
Valine	
L-Isoleucine	
Leucine	
Glutamine	
Phenylalanine	
Alanine	
Acetone	
Creatinine	
Creatine	
Lactic acid	
DL-Tyrosine	
Histidine	
Trimethylamine-N-oxide	
Citric acid	
K-EDTA*	

*: Ca-EDTA and K-EDTA are not endogenous serum metabolites, and thus K-EDTA is not included as a quantified serum metabolite for further analysis.

Table S3. List of measured urine metabolites

Quantified	Not quantifiable
Creatinine	D-Galactose
D-Lactose	Myo-Inositol
Alanine	3-Hydroxybutyric acid
Acetic acid	Methionine
Succinic acid	1-Methylhistidine
Citric acid	Benzoic acid
Dimethylamine	4-Aminobutyric acid
Trimethylamine	D-Mannitol
Betaine	D-Mannose
Glycine	Adenosine
Fumaric acid	Imidazole
Formic acid	D-Mandelic acid
1-Methylnicotinamide	2-Furoylglycine
N,N-Dimethylglycine	2-Methylsuccinic acid
Hippuric acid	1-Methyladenosine
Valine	
Arginine	
Trigonelline	
Pyruvic acid	
Oxaloacetic acid	
Allantoin	
Caffeine	
Inosine	
Allopurinol	
Tartaric acid	
Proline betaine	
Guanidinoacetic acid	
D-Glucose	
Lactic acid	
Taurine	
Acetone	
Acetoacetic acid	
Creatine	
Sarcosine	
2-Oxoglutaric acid	

Table S4. Effects of FTCs on lipoprotein parameter concentrations

Lipoprotein parameters	Consecutive FTCs								Compared to FTC1							
	Adjusted p-values of Wilcoxon tests				Median percentage change*				Adjusted p-values of Wilcoxon tests				Median percentage change*			
	FTC1-2	FTC2-3	FTC3-4	FTC4-5	FTC1-2	FTC2-3	FTC3-4	FTC4-5	FTC1-2	FTC1-3	FTC1-4	FTC1-5	FTC1-2	FTC1-3	FTC1-4	FTC1-5
TPTG [mg/dL]	0,731	0,324	0,440	0,955	0,42	-0,73	0,57	-0,15	0,731	0,364	0,583	0,792	0,42	-0,28	0,06	0,04
TPCH [mg/dL]	0,977	0,311	0,291	0,955	0,83	-0,41	1,13	-0,28	0,977	0,435	0,871	0,878	0,83	-0,56	-0,33	0,41
LDCH [mg/dL]	0,093	0,230	0,617	0,990	-0,84	-1,12	-0,24	-0,77	0,093	0,014	0,003	0,029	-0,84	-3,31	-5,48	-3,38
HDCH [mg/dL]	0,896	0,311	0,357	0,990	-0,42	-0,64	1,51	-0,28	0,896	0,132	0,485	0,633	-0,42	-1,34	-0,51	-0,22
TPA1 [mg/dL]	0,896	0,311	0,303	0,955	-0,44	-0,72	0,78	-0,14	0,896	0,382	0,721	0,832	-0,44	-0,87	-0,54	0,36
TPA2 [mg/dL]	0,541	0,820	0,202	0,955	-1,40	0,21	2,28	-1,00	0,541	0,364	0,796	0,863	-1,40	-1,16	-0,86	0,84
TPAB [mg/dL]	0,533	0,747	0,634	0,955	-0,29	-0,67	0,42	-0,50	0,533	0,143	0,174	0,189	-0,29	-1,57	-1,68	-1,76
LDHD [-/-]	0,134	0,311	0,065	0,955	-1,35	-0,86	-1,69	-0,17	0,134	0,081	0,004	0,086	-1,35	-1,97	-3,35	-3,34
ABA1 [-/-]	0,167	0,747	0,185	0,955	0,00	0,00	-0,78	0,00	0,167	0,276	0,016	0,088	0,00	0,00	-1,58	-1,44
TBPN [nmol/L]	0,533	0,747	0,634	0,955	-0,29	-0,67	0,42	-0,51	0,533	0,143	0,174	0,176	-0,29	-1,56	-1,68	-1,76
VLPN [nmol/L]	0,237	0,132	0,071	0,662	1,44	1,59	1,62	1,19	0,237	0,015	0,004	0,022	1,44	2,35	4,32	4,43
IDPN [nmol/L]	0,177	0,983	0,071	0,662	5,53	1,21	8,20	5,96	0,177	0,112	0,004	0,010	5,53	6,11	11,44	15,69
LDPN [nmol/L]	0,345	0,740	0,905	0,955	-0,64	-0,62	0,45	-1,20	0,345	0,072	0,066	0,176	-0,64	-2,20	-2,69	-2,50
L1PN [nmol/L]	0,093	1,000	0,308	0,955	4,17	0,01	1,11	0,83	0,093	0,013	0,001	0,009	4,17	4,32	5,47	7,84
L2PN [nmol/L]	0,533	0,827	0,431	0,955	1,75	-1,34	-0,96	3,81	0,533	0,933	0,779	0,832	1,75	-0,75	-1,01	0,84
L3PN [nmol/L]	0,942	0,132	0,585	0,955	-0,15	-2,18	-2,44	0,68	0,942	0,686	0,382	0,751	-0,15	-0,06	-0,72	0,72
L4PN [nmol/L]	0,093	0,132	0,774	0,955	-8,57	-4,82	-1,76	-2,62	0,093	0,013	0,004	0,129	-8,57	-8,68	-12,27	-6,62
L5PN [nmol/L]	0,093	0,820	0,717	0,955	-10,30	-1,59	-0,29	-4,31	0,093	0,014	0,003	0,053	-10,30	-8,91	-14,58	-16,12
L6PN [nmol/L]	0,345	0,747	0,569	0,955	-4,07	1,13	4,77	0,84	0,345	0,288	0,445	0,194	-4,07	-4,70	-4,93	-9,82
VLTG [mg/dL]	0,499	0,311	0,717	0,955	-0,95	-1,73	1,16	-1,51	0,499	0,012	0,006	0,043	-0,95	-3,75	-3,36	-5,36
IDTG [mg/dL]	0,134	0,196	0,617	0,955	-1,50	-7,63	-0,61	-3,22	0,134	0,014	0,004	0,016	-1,50	-7,64	-8,54	-12,76
LDTG [mg/dL]	0,535	0,700	0,963	0,990	0,60	-0,52	-0,07	-0,11	0,535	0,967	0,792	0,747	0,60	-0,41	0,50	2,98
HDTG [mg/dL]	0,533	0,867	0,869	0,955	0,47	0,61	0,61	-0,21	0,533	0,364	0,583	0,378	0,47	0,52	2,64	2,03

VLCH [mg/dL]	0,093	0,700	0,015	0,662	6,93	0,66	3,91	3,29	0,093	0,017	0,003	0,020	6,93	8,79	11,96	17,94
IDCH [mg/dL]	0,285	0,912	0,119	0,922	6,02	0,00	12,29	4,16	0,285	0,214	0,015	0,009	6,02	7,67	18,83	20,49
VLFC [mg/dL]	0,438	0,955	0,015	0,662	1,78	-0,25	2,93	1,28	0,438	0,522	0,090	0,129	1,78	2,65	5,56	6,78
IDFC [mg/dL]	0,134	0,834	0,185	0,943	7,94	0,00	8,69	5,38	0,134	0,107	0,009	0,011	7,94	4,80	14,52	21,77
LDFC [mg/dL]	0,345	0,176	0,951	0,955	-1,16	-1,92	-0,76	-0,31	0,345	0,045	0,014	0,230	-1,16	-2,17	-2,82	-2,41
HDFC [mg/dL]	0,787	0,311	0,303	0,990	1,67	-2,50	2,23	-0,53	0,787	0,329	0,505	0,832	1,67	-0,53	-0,81	1,07
VLPL [mg/dL]	1,000	0,584	0,273	0,955	0,21	-0,81	1,94	1,08	1,000	0,364	0,894	0,863	0,21	-1,26	1,75	0,46
IDPL [mg/dL]	0,859	0,132	0,440	0,955	0,05	-3,61	2,09	-1,83	0,859	0,045	0,164	0,218	0,05	-5,72	-3,22	-2,98
LDPL [mg/dL]	0,093	0,132	0,590	0,990	-0,86	-0,93	-0,62	-0,95	0,093	0,012	0,004	0,021	-0,86	-3,23	-3,89	-2,49
HDPL [mg/dL]	0,448	0,311	0,313	0,955	0,82	-0,96	0,90	0,03	0,448	0,655	0,295	0,194	0,82	-0,32	1,05	0,75
HDA1 [mg/dL]	0,723	0,311	0,440	0,955	-0,29	-0,81	0,62	-0,32	0,723	0,153	0,404	0,856	-0,29	-1,42	-1,12	-0,04
HDA2 [mg/dL]	0,535	0,747	0,185	0,955	-1,17	0,35	2,20	-1,21	0,535	0,435	0,908	0,832	-1,17	-1,07	-1,15	0,58
VLAB [mg/dL]	0,237	0,132	0,071	0,662	1,41	1,64	1,61	1,22	0,237	0,018	0,005	0,025	1,41	2,38	4,30	4,32
IDAB [mg/dL]	0,170	0,983	0,082	0,662	5,92	0,95	8,29	5,89	0,170	0,112	0,006	0,011	5,92	5,98	11,36	15,58
LDAB [mg/dL]	0,345	0,740	0,905	0,955	-0,64	-0,63	0,45	-1,20	0,345	0,072	0,066	0,176	-0,64	-2,21	-2,69	-2,50
V1TG [mg/dL]	0,137	0,311	0,905	0,776	-5,27	-3,59	-2,37	-3,92	0,137	0,001	0,015	0,000	-5,27	-7,30	-9,52	-11,39
V2TG [mg/dL]	0,535	0,324	0,590	0,933	-0,82	-4,13	-1,60	-2,79	0,535	0,252	0,145	0,176	-0,82	-1,80	-4,13	-4,50
V3TG [mg/dL]	0,631	0,834	0,964	0,955	2,03	-1,13	0,59	-0,75	0,631	0,999	1,000	0,863	2,03	2,41	1,40	4,57
V4TG [mg/dL]	0,476	0,761	0,617	0,955	1,96	-0,96	0,15	0,81	0,476	0,859	0,340	0,529	1,96	1,48	2,13	3,18
V5TG [mg/dL]	0,531	0,985	0,452	0,955	2,56	-0,12	0,58	-0,40	0,531	0,872	0,617	0,318	2,56	0,60	0,77	2,56
V1CH [mg/dL]	0,161	0,615	0,003	0,922	2,96	1,09	4,08	3,09	0,161	0,069	0,010	0,075	2,96	5,55	13,56	12,77
V2CH [mg/dL]	0,170	0,747	0,065	0,955	12,92	2,20	8,62	3,59	0,170	0,097	0,014	0,061	12,92	12,22	23,47	23,53
V3CH [mg/dL]	0,093	0,747	0,071	0,955	9,70	0,00	3,20	0,91	0,093	0,015	0,006	0,055	9,70	7,84	20,73	24,93
V4CH [mg/dL]	0,093	0,840	0,031	0,662	4,18	0,18	6,88	4,96	0,093	0,013	0,003	0,009	4,18	6,70	14,01	21,52
V5CH [mg/dL]	0,610	0,740	0,523	0,955	1,88	0,84	-2,03	-0,04	0,610	0,132	0,560	0,387	1,88	2,16	2,08	3,48
V1FC [mg/dL]	0,631	0,179	0,653	0,955	-0,22	-4,53	0,00	-0,55	0,631	0,053	0,066	0,025	-0,22	-4,26	-1,64	-2,91
V2FC [mg/dL]	0,134	0,311	0,062	0,662	7,00	5,23	5,64	5,32	0,134	0,030	0,006	0,033	7,00	17,81	30,83	32,02
V3FC [mg/dL]	0,120	0,311	0,038	0,662	8,11	0,58	3,55	1,79	0,120	0,013	0,004	0,025	8,11	10,10	19,73	25,24

V4FC [mg/dL]	0,093	0,700	0,065	0,706	9,00	0,00	8,90	4,01	0,093	0,028	0,004	0,009	9,00	12,09	24,93	39,05
V5FC [mg/dL]	0,304	0,176	0,105	0,706	2,85	7,45	10,04	7,06	0,304	0,090	0,015	0,011	2,85	6,50	22,28	24,74
V1PL [mg/dL]	0,237	0,345	0,634	0,662	-3,35	-4,27	-2,44	-4,43	0,237	0,042	0,014	0,009	-3,35	-4,02	-6,80	-13,71
V2PL [mg/dL]	1,000	0,420	0,894	0,662	2,19	-2,64	-0,44	-2,75	1,000	0,591	0,779	0,523	2,19	-0,77	-0,22	1,57
V3PL [mg/dL]	0,112	1,000	0,273	0,955	3,84	0,00	2,54	-0,15	0,112	0,110	0,008	0,043	3,84	3,30	6,80	6,04
V4PL [mg/dL]	0,162	0,820	0,071	0,922	3,45	-1,25	1,93	3,29	0,162	0,112	0,013	0,056	3,45	3,77	5,51	7,16
V5PL [mg/dL]	0,295	0,596	0,734	0,969	1,76	0,79	-0,86	0,00	0,295	0,070	0,066	0,102	1,76	1,67	3,70	1,64
L1TG [mg/dL]	0,093	0,615	0,617	0,955	3,62	1,16	-0,32	1,31	0,093	0,013	0,004	0,017	3,62	3,92	5,60	7,69
L2TG [mg/dL]	0,120	0,910	0,979	0,955	7,14	0,65	-1,46	0,00	0,120	0,108	0,019	0,078	7,14	3,00	4,76	9,38
L3TG [mg/dL]	0,170	0,311	0,717	0,955	-0,52	-0,56	0,00	-0,78	0,170	0,030	0,009	0,041	-0,52	-1,41	-1,45	-1,91
L4TG [mg/dL]	0,457	0,492	0,685	0,990	-5,08	-3,44	-1,25	-4,50	0,457	0,112	0,066	0,482	-5,08	-7,15	-12,58	-4,66
L5TG [mg/dL]	0,735	0,747	0,774	0,955	5,33	-3,38	0,00	-0,39	0,735	0,706	0,478	0,789	5,33	0,00	0,00	1,21
L6TG [mg/dL]	0,345	0,834	0,774	0,955	-2,23	0,28	0,72	-1,91	0,345	0,252	0,340	0,088	-2,23	-3,73	-3,09	-7,14
L1CH [mg/dL]	0,093	0,910	0,291	0,955	4,86	-0,82	1,78	1,06	0,093	0,018	0,001	0,011	4,86	4,97	5,77	7,15
L2CH [mg/dL]	0,535	0,634	0,357	0,955	1,21	-1,70	-0,90	2,92	0,535	0,933	0,634	0,878	1,21	-0,60	-1,33	0,18
L3CH [mg/dL]	0,956	0,132	0,542	0,955	-0,69	-2,13	-1,84	0,45	0,956	0,476	0,164	0,218	-0,69	-1,59	-1,95	-2,14
L4CH [mg/dL]	0,093	0,132	0,532	0,955	-10,15	-4,97	-0,52	-2,60	0,093	0,011	0,004	0,053	-10,15	-9,88	-12,88	-10,87
L5CH [mg/dL]	0,093	0,747	0,634	0,955	-12,07	-0,84	-4,81	-3,13	0,093	0,012	0,001	0,053	-12,07	-11,32	-15,10	-17,90
L6CH [mg/dL]	0,295	0,906	0,590	0,955	-5,89	1,17	6,38	0,56	0,295	0,131	0,346	0,124	-5,89	-5,40	-7,18	-11,30
L1FC [mg/dL]	0,093	0,834	0,403	0,955	4,79	-0,70	2,03	1,25	0,093	0,017	0,004	0,011	4,79	3,79	6,52	8,47
L2FC [mg/dL]	0,631	0,584	0,928	0,955	0,42	-1,69	0,15	0,45	0,631	0,469	0,511	0,751	0,42	-1,78	-0,71	1,69
L3FC [mg/dL]	0,731	0,311	0,979	0,955	-0,60	-2,80	0,28	0,90	0,731	0,159	0,064	0,474	-0,60	-2,77	-3,33	-1,41
L4FC [mg/dL]	0,112	0,311	0,590	0,955	-5,89	-3,75	-2,29	-2,83	0,112	0,013	0,004	0,093	-5,89	-6,19	-10,49	-9,32
L5FC [mg/dL]	0,126	0,752	0,738	0,955	-6,69	-1,73	2,21	-3,33	0,126	0,017	0,009	0,090	-6,69	-7,66	-10,82	-14,83
L6FC [mg/dL]	0,285	0,521	0,590	0,955	-7,60	-2,93	-2,72	-2,84	0,285	0,014	0,009	0,053	-7,60	-6,14	-9,09	-10,72
L1PL [mg/dL]	0,093	0,958	0,303	0,955	4,01	-0,24	1,06	0,75	0,093	0,036	0,001	0,020	4,01	4,52	5,34	6,33
L2PL [mg/dL]	0,535	0,615	0,373	0,955	1,90	-1,34	-0,90	2,84	0,535	1,000	0,721	1,000	1,90	-0,32	-0,77	0,88
L3PL [mg/dL]	0,956	0,132	0,494	0,955	-0,52	-1,96	-1,98	0,39	0,956	0,602	0,346	0,308	-0,52	-0,72	-1,32	-0,18

L4PL [mg/dL]	0,093	0,132	0,483	0,955	-9,57	-3,53	-1,75	-2,45	0,093	0,003	0,002	0,049	-9,57	-10,72	-12,35	-14,88
L5PL [mg/dL]	0,093	0,747	0,590	0,955	-8,96	-1,32	-0,23	-2,78	0,093	0,011	0,001	0,053	-8,96	-8,98	-15,28	-14,67
L6PL [mg/dL]	0,304	0,955	0,634	0,955	-4,45	0,50	3,76	-0,04	0,304	0,143	0,320	0,088	-4,45	-3,71	-5,86	-9,73
L1AB [mg/dL]	0,093	1,000	0,308	0,955	4,17	-0,04	1,14	0,84	0,093	0,013	0,003	0,009	4,17	4,34	5,49	7,84
L2AB [mg/dL]	0,533	0,823	0,431	0,955	1,74	-1,34	-0,95	3,80	0,533	0,933	0,761	0,832	1,74	-0,76	-1,03	0,85
L3AB [mg/dL]	0,940	0,149	0,585	0,955	-0,17	-2,13	-2,45	0,71	0,940	0,665	0,404	0,751	-0,17	-0,08	-0,71	0,73
L4AB [mg/dL]	0,093	0,132	0,774	0,955	-8,58	-4,79	-1,71	-2,54	0,093	0,014	0,004	0,129	-8,58	-8,66	-12,27	-6,61
L5AB [mg/dL]	0,093	0,820	0,717	0,955	-10,27	-1,63	-0,16	-4,32	0,093	0,013	0,003	0,053	-10,27	-8,96	-14,56	-16,22
L6AB [mg/dL]	0,345	0,747	0,569	0,955	-4,06	1,15	4,79	0,84	0,345	0,276	0,445	0,194	-4,06	-4,69	-4,96	-9,83
H1TG [mg/dL]	0,254	0,747	0,590	0,955	3,65	5,41	2,02	1,55	0,254	0,131	0,066	0,176	3,65	4,38	6,96	6,81
H2TG [mg/dL]	0,373	0,955	0,440	0,955	3,20	-0,97	-1,75	-0,15	0,373	0,706	0,758	0,509	3,20	0,00	1,29	2,73
H3TG [mg/dL]	0,428	0,521	0,759	0,955	0,20	1,66	0,00	-0,65	0,428	0,339	0,242	0,328	0,20	0,28	1,17	-0,38
H4TG [mg/dL]	0,170	0,311	0,202	0,955	-1,01	1,26	-0,92	-0,14	0,170	0,686	0,404	0,175	-1,01	-0,39	-0,83	-1,36
H1CH [mg/dL]	0,170	0,311	0,569	0,955	2,42	-0,79	0,49	0,74	0,170	0,602	0,164	0,194	2,42	1,77	1,69	2,54
H2CH [mg/dL]	0,535	0,634	0,303	0,990	1,08	-1,01	1,42	0,65	0,535	0,758	0,518	0,516	1,08	-0,90	0,06	1,53
H3CH [mg/dL]	0,856	1,000	0,253	0,955	0,47	0,29	1,60	0,08	0,856	0,933	0,589	0,489	0,47	0,27	0,56	-0,04
H4CH [mg/dL]	0,093	0,834	0,905	0,955	-2,98	0,10	-0,01	-0,75	0,093	0,013	0,008	0,043	-2,98	-3,00	-3,82	-4,81
H1FC [mg/dL]	0,631	0,230	0,313	0,955	0,97	-3,34	2,21	-1,64	0,631	0,418	0,896	0,832	0,97	-0,69	-0,28	1,61
H2FC [mg/dL]	0,523	0,747	0,331	0,955	2,76	-1,71	3,90	0,85	0,523	0,956	0,295	0,093	2,76	-0,47	2,65	4,36
H3FC [mg/dL]	0,762	0,560	0,743	0,955	-0,07	-2,85	0,25	-0,19	0,762	0,382	0,404	0,751	-0,07	-1,62	-2,72	1,10
H4FC [mg/dL]	0,428	0,747	0,979	0,969	-1,77	-0,31	-0,16	-2,34	0,428	0,128	0,135	0,269	-1,77	-1,59	-2,84	-2,00
H1PL [mg/dL]	0,093	0,311	0,403	0,955	4,15	-1,35	0,80	1,19	0,093	0,105	0,007	0,057	4,15	3,42	2,75	4,98
H2PL [mg/dL]	0,123	0,761	0,308	0,990	2,66	-0,53	0,72	0,76	0,123	0,118	0,059	0,043	2,66	1,59	2,53	4,86
H3PL [mg/dL]	0,177	0,984	0,303	0,955	1,34	-0,82	1,08	0,68	0,177	0,252	0,054	0,053	1,34	1,04	2,30	2,07
H4PL [mg/dL]	0,093	0,607	0,990	0,955	-1,37	-0,48	-0,21	-0,69	0,093	0,017	0,033	0,088	-1,37	-1,64	-1,55	-2,61
H1A1 [mg/dL]	0,237	0,311	0,313	0,955	2,40	-2,02	2,02	1,39	0,237	0,597	0,230	0,124	2,40	-1,21	1,92	4,02
H2A1 [mg/dL]	0,533	0,747	0,273	0,955	0,99	0,16	0,74	0,03	0,533	0,602	0,174	0,176	0,99	0,57	1,64	1,33
H3A1 [mg/dL]	0,648	0,955	0,237	0,955	1,00	-0,31	1,59	0,32	0,648	0,721	0,174	0,172	1,00	0,36	1,38	0,83

H4A1 [mg/dL]	0,123	0,747	0,905	0,955	-1,70	0,10	0,11	-0,54	0,123	0,012	0,010	0,053	-1,70	-2,32	-2,77	-3,52
H1A2 [mg/dL]	0,112	0,958	0,136	0,955	6,16	-0,47	6,43	1,44	0,112	0,090	0,010	0,011	6,16	4,48	7,90	13,95
H2A2 [mg/dL]	0,145	0,837	0,131	0,955	5,05	-0,52	3,58	0,27	0,145	0,107	0,011	0,020	5,05	4,99	9,60	10,77
H3A2 [mg/dL]	0,467	0,955	0,185	0,955	0,92	-0,09	2,39	0,09	0,467	0,660	0,066	0,104	0,92	0,12	2,64	1,98
H4A2 [mg/dL]	0,156	0,834	0,348	0,955	-1,88	0,70	1,55	-0,71	0,156	0,129	0,202	0,150	-1,88	-2,88	-2,05	-4,52

*: An example for calculating median percentage change: median percentage change of FTC1-2 = median ((FTC2-FTC1)/FTC1*100)

	Significant accumulated increase at FTC5 compared to FTC1
	Significant accumulated decrease at FTC5 compared to FTC1

Table S5. Effects of FTCs on serum metabolite concentrations

Serum metabolites	Consecutive FTCs								Compared to FTC1							
	Adjusted p-values of Wilcoxon tests				Median percentage change*				Adjusted p-values of Wilcoxon tests				Median percentage change*			
	FTC1-2	FTC2-3	FTC3-4	FTC4-5	FTC1-2	FTC2-3	FTC3-4	FTC4-5	FTC1-2	FTC1-3	FTC1-4	FTC1-5	FTC1-2	FTC1-3	FTC1-4	FTC1-5
Acetic acid	0,990	0,875	0,783	0,814	11,88	0,75	2,29	2,76	0,990	0,315	0,118	0,010	11,88	6,65	15,66	29,06
Pyruvic acid	0,990	0,875	0,783	0,753	-0,57	-1,62	1,13	2,49	0,990	0,945	0,840	0,753	-0,57	-3,15	1,23	3,99
Acetoacetic acid	0,990	0,875	0,990	0,753	8,52	-2,27	0,80	6,22	0,990	0,945	0,668	0,604	8,52	7,92	1,74	5,33
Formic acid	0,990	0,875	0,807	0,977	-6,21	6,23	0,76	-1,99	0,990	0,990	0,728	0,945	-6,21	-5,80	3,21	4,74
Glycine	0,990	0,921	0,807	0,814	4,78	-1,96	-1,98	2,03	0,990	0,945	0,705	0,604	4,78	1,02	1,31	1,82
D-Glucose	0,990	0,977	0,783	0,852	-0,48	0,18	0,91	-0,16	0,990	0,945	0,840	0,945	-0,48	-0,64	0,14	0,00
Valine	0,990	0,962	0,693	0,977	1,42	-5,43	4,58	-0,88	0,990	0,990	0,668	0,693	1,42	2,47	2,90	1,01
L-Isoleucine	0,990	0,875	0,807	0,753	7,16	3,25	-2,34	-3,63	0,990	0,315	0,668	0,945	7,16	11,90	5,69	-3,83
Leucine	0,990	0,875	0,807	0,735	-1,10	5,43	-2,88	-13,30	0,990	0,958	0,990	0,532	-1,10	2,10	-0,74	-7,70
Glutamine	0,990	0,875	0,807	0,753	0,14	-1,61	-0,08	-1,78	0,990	0,958	0,668	0,945	0,14	1,11	2,06	-1,32
Phenylalanine	0,990	0,875	0,807	0,753	-2,54	3,78	3,87	8,39	0,990	0,958	0,840	0,604	-2,54	-2,90	4,34	5,03
Alanine	0,990	0,962	0,783	0,814	0,07	0,45	1,71	1,57	0,990	0,958	0,668	0,693	0,07	-0,90	1,83	1,21
Acetone	0,990	1,000	0,783	0,103	-7,32	-3,20	-9,26	24,27	0,990	0,958	0,668	0,945	-7,32	-10,08	-18,76	-7,90
Creatinine	0,990	0,875	0,788	0,753	4,91	-3,15	2,43	-1,41	0,990	0,980	0,705	0,945	4,91	1,83	3,95	-4,04
Creatine	0,990	0,875	0,783	0,735	-1,13	5,52	-6,32	10,07	0,990	0,945	0,705	0,604	-1,13	6,86	-6,61	17,10
Lactic acid	0,990	0,962	0,990	0,735	0,20	-0,66	0,43	1,63	0,990	0,945	0,668	0,604	0,20	1,71	1,90	2,07
DL-Tyrosine	0,990	0,962	0,783	0,990	2,69	-1,47	1,13	3,17	0,990	0,945	0,557	0,315	2,69	3,90	3,11	5,87
Histidine	0,990	0,875	0,783	0,753	2,76	-2,85	4,01	-2,29	0,990	0,990	0,840	0,945	2,76	2,69	3,61	2,62
Trimethylamine-																
N-oxide	0,990	0,875	0,783	0,753	1,60	65,74	-12,14	33,32	0,990	0,945	0,977	0,921	1,60	40,40	-16,81	58,65
Citric acid	0,990	0,962	0,807	0,814	-7,65	0,36	-7,13	5,34	0,990	0,980	0,668	0,990	-7,65	-11,72	-11,17	3,72

*: An example for calculating median percentage change: median percentage change of FTC1-2 = median ((FTC2-FTC1)/FTC1*100)

Table S6. Effects of FTCs on urine metabolite concentrations

Urine Metabolites	Consecutive FTCs								Compared to FTC1							
	Adjusted p-values of Wilcoxon tests				Median percentage change*				Adjusted p-values of Wilcoxon tests				Median percentage change*			
	FTC1-2	FTC2-3	FTC3-4	FTC4-5	FTC1-2	FTC2-3	FTC3-4	FTC4-5	FTC1-2	FTC1-3	FTC1-4	FTC1-5	FTC1-2	FTC1-3	FTC1-4	FTC1-5
Creatinine	0,919	0,506	1,000	0,844	0,20	0,41	0,32	-0,08	0,919	0,792	0,986	0,758	0,20	0,42	0,27	-0,32
Creatine	0,919	0,902	1,000	1,000	-0,09	1,16	-2,45	-29,24	0,919	0,834	0,986	0,862	-0,09	-9,01	-1,67	0,49
D-Glucose	0,919	0,902	1,000	0,844	3,85	1,53	3,49	-2,90	0,919	0,792	0,464	0,754	3,85	9,53	6,74	4,77
D-Lactose	0,829	0,957	1,000	1,000	-1,42	0,49	-2,60	0,38	0,829	0,804	0,986	0,758	-1,42	1,15	0,13	-4,10
Alanine	0,919	0,506	1,000	1,000	0,44	0,74	-0,06	-0,03	0,919	0,420	0,986	0,525	0,44	1,76	0,73	0,78
Lactic acid	0,541	0,902	1,000	1,000	-2,94	3,28	-1,28	-0,70	0,541	0,834	0,986	0,758	-2,94	0,18	-1,00	-1,03
Acetic acid	0,541	0,525	1,000	1,000	3,54	3,95	-0,32	-1,41	0,541	0,245	0,464	0,263	3,54	4,60	4,74	4,78
Succinic acid	0,541	0,902	1,000	1,000	6,20	1,07	0,77	0,02	0,541	0,792	0,986	0,758	6,20	5,85	1,90	2,71
Citric acid	0,583	0,420	1,000	0,550	-0,17	1,52	0,84	-1,36	0,583	0,804	0,986	0,525	-0,17	0,02	0,55	-0,54
Dimethylamine	0,919	0,420	1,000	1,000	0,53	1,02	-0,94	-0,73	0,919	0,792	0,986	0,758	0,53	0,80	0,08	-0,34
Trimethylamine	0,829	0,957	1,000	1,000	1,10	-0,18	-1,66	0,06	0,829	0,804	0,986	0,758	1,10	2,48	1,24	1,16
Betaine	0,829	0,957	1,000	0,805	0,42	0,65	0,81	-1,65	0,829	0,792	0,986	0,926	0,42	2,65	1,33	0,11
Glycine	0,919	0,506	1,000	1,000	0,56	0,96	-1,09	0,53	0,919	0,804	0,986	0,926	0,56	-0,02	0,10	-0,50
Fumaric acid	0,541	0,817	1,000	1,000	-4,69	2,95	-1,58	-1,18	0,541	0,834	0,679	0,525	-4,69	0,08	-5,52	-3,34
Formic acid	0,919	0,420	1,000	0,844	-0,18	2,41	1,28	-2,73	0,919	0,245	0,464	0,754	-0,18	3,53	4,24	2,58
1-Methylnicotinamide	0,829	0,817	1,000	1,000	-1,50	2,17	-0,01	-0,06	0,829	0,804	0,986	0,869	-1,50	2,34	2,71	-0,40
N,N-Dimethylglycine	0,829	0,902	1,000	1,000	-0,21	1,61	0,15	0,40	0,829	0,834	0,986	0,881	-0,21	1,06	2,53	0,45
Taurine	0,919	0,913	1,000	0,778	0,62	-0,20	0,60	-1,61	0,919	0,804	0,986	0,525	0,62	-0,53	-0,10	-1,75
Hippuric acid	0,541	0,917	1,000	1,000	1,08	-0,78	-0,41	0,41	0,541	0,792	0,986	0,758	1,08	0,59	0,09	-0,68

Acetone	0,923	0,902	1,000	0,550	0,55	-0,85	-2,07	2,55	0,923	0,834	0,986	1,000	0,55	-0,99	-1,79	-0,01
Acetoacetic acid	0,541	0,902	1,000	1,000	-1,58	0,59	-0,46	0,37	0,541	0,792	0,986	0,881	-1,58	2,96	-0,48	-0,34
Valine	0,541	0,902	1,000	0,817	1,70	-1,61	-1,00	2,51	0,541	0,792	0,988	0,840	1,70	1,17	-1,09	-0,22
Arginine	0,829	0,506	1,000	1,000	0,34	1,24	0,29	-0,45	0,829	0,792	0,464	0,754	0,34	1,49	2,21	2,25
Sarcosine	0,919	0,957	1,000	0,550	0,22	0,55	7,27	-5,32	0,919	0,792	0,986	0,525	0,22	0,00	4,74	-2,98
Trigonelline	0,541	0,902	1,000	1,000	2,49	-1,39	-0,17	0,78	0,541	0,792	0,986	0,754	2,49	0,44	0,38	2,35
Pyruvic acid	0,919	0,420	1,000	0,550	-0,48	2,26	-2,91	1,40	0,919	0,804	0,986	0,758	-0,48	1,65	0,14	0,20
Oxaloacetic acid	0,541	0,817	1,000	1,000	1,65	-0,40	0,26	0,02	0,541	0,930	0,986	0,881	1,65	0,21	0,12	0,86
Allantoin	0,541	0,902	1,000	0,835	7,21	1,10	-1,78	3,57	0,541	0,245	0,986	0,525	7,21	7,72	-0,98	6,18
Caffeine	0,919	0,957	1,000	0,817	-0,03	0,15	0,29	-0,75	0,919	0,834	0,986	0,758	-0,03	0,31	0,75	-0,64
Inosine	0,541	0,817	1,000	0,550	-3,79	2,76	0,32	-0,74	0,541	0,792	0,986	0,754	-3,79	-1,61	-2,73	-1,03
Allopurinol	0,829	0,902	1,000	1,000	-0,81	0,47	0,98	-0,13	0,829	0,804	0,986	0,758	-0,81	-0,22	0,44	1,90
Tartaric acid	1,000	0,907	1,000	0,844	-3,27	-1,97	0,30	-3,07	1,000	0,792	0,986	0,263	-3,27	-1,51	-2,47	-5,14
Proline betaine	0,919	0,506	1,000	0,778	0,26	0,99	-0,25	-1,49	0,919	0,792	0,986	0,886	0,26	3,66	0,25	-0,06
2-Oxoglutaric acid	0,919	0,990	1,000	0,550	-1,12	-1,37	-2,22	6,25	0,919	0,834	0,986	0,881	-1,12	0,03	-9,98	-0,73
Guanidinoacetic acid	1,000	0,817	0,665	0,550	0,38	0,80	-1,24	0,94	1,000	0,792	1,000	0,758	0,38	0,88	0,07	0,24

*: An example for calculating median percentage change: median percentage change of FTC1-2 = median((FTC2-FTC1)/FTC1*100)