

Elisabeth Nordvik Eriksen og Åse Kristin
Bjørneraas Hopen

Holdbarhet av metabolitter i urin Metabolite stability in human urine

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Beathe Sitter og Randi Utne Holt
Mai 2020

NTNU
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

Elisabeth Nordvik Eriksen og Åse Kristin Bjørneraas
Hopen

Holdbarhet av metabolitter i urin

Metabolite stability in human urine

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Beathe Sitter og Randi Utne Holt
Mai 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet i forbindelse med fullføring av bachelorgrad i bioingeniørfag ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet i Trondheim. Bacheloroppgaven ble gitt av Beathe Sitter ved Institutt for sirkulasjon og billediagnostikk, NTNU. Opprinnelig gikk bacheloroppgaven ut på å utføre en holdbarhetsstudie på metabolitter i urin, men den ble endret til en analytisk oppgave underveis på grunn av utbruddet av koronaviruset SARS-CoV-2 (covid-19) i Norge våren 2020.

Først og fremst ønsker vi å takke vår faglige veileder, førsteamanuensis ved Institutt for sirkulasjon og billediagnostikk, Beathe Sitter. Beathe har delt av sin kunnskap, gitt oss god innføring i emnet og vist oss stor tillit under arbeidet med oppgaven. Vi ønsker også å rette en stor takk til vår prosessveileder fra bioingeniørutdanningen, førsteamanuensis ved Institutt for bioingeniørfag, Randi Utne Holt. Randi har kommet med gode innspill og refleksjoner underveis, og generelt vært en viktig støtte for oss i arbeidet med oppgaven. I tillegg ønsker vi å takke Siri Drogset, høgskolelærer ved Institutt for bioingeniørfag, for råd i forbindelse med statistikk i bacheloroppgaven.

Elisabeth N. Eriksen

Elisabeth Nordvik Eriksen
Trondheim, 19.05.2020

Åse K.B. Hopen

Åse Kristin Bjørneraas Hopen
Smøla, 19.05.2020

Sammendrag

Institutt for sirkulasjon og billedbehandling (ISB) ved NTNU og St. Olavs hospital samarbeider i et større forskningsprosjekt om å etablere en biobank med urinprøver fra friske frivillige og fra pasienter med psoriasis og psoriasisartritt. De ønsker å undersøke i hvilken grad lagringsbetingelser kan påvirke måleresultatet av metabolitter i urinprøver, noe som danner grunnlaget for denne bacheloroppgaven.

I bacheloroppgaven blir lagringsinstabilitet av metabolittene alanin, citrat, glysin, hippurate og trigonelline i urin undersøkt, samt at det blir undersøkt i hvilken grad man kan identifisere signifikante forskjeller av metabolittkonsentrasjoner mellom ulike donorgrupper. Analysen baserer seg på tidligere innhentet data. Datamaterialet består av MR-data fra urinprøver fra totalt 63 donorer. Urinprøvene var lagret i ulike tidsrom før frysing, og ble tint opp før analyse med MR-spektroskopi.

Etter inndeling i grupper ble datamaterialet analysert. Gjennomsnitt, standardavvik og variasjonskoeffisienter ble beregnet. Tosidig t-test ble brukt for å sammenligne gruppene, og p-verdier $< 0,05$ ble vurdert som statistisk signifikant forskjell mellom grupper.

Resultatene viste at det er statistisk signifikant forskjell mellom gruppene «kvinner» og «menn» for prøver av citrat lagret < 2 timer før frys, og at metabolittene trolig er stabile ved lagring ≥ 2 timer før frys. Det kan likevel se ut som at resultatene i stor grad er avhengig av verdiene som ble inkludert i de ulike gruppene, og at variasjoner som blir funnet mellom prøver antagelig er større enn effekter av prøvebehandling.

Summary

Department of Circulation and Medical Imaging (ISB) at NTNU and St. Olavs Hospital are collaborating in a major research project to establish a biobank with urine samples from healthy volunteers and from patients with psoriasis and psoriatic arthritis. ISB wants to investigate the extent to which storage conditions can affect the measurement result of metabolites in urine samples, which forms the basis for this bachelor's thesis.

In this bachelor's thesis the storage instability of the metabolites alanine, citrate, glycine, hippurate and trigonelline is examined, as well as to what extent significant differences of metabolite concentrations between groups can be identified. The assay is based on previously collected data. The data material consists of samples from the total of 63 donors. The samples have been stored for different periods of time before assay with MR spectroscopy.

After dividing the data material into groups, it was processed with calculation of averages, standard deviations, and variation coefficients. A two-tailed t-test was used to compare the groups, and a p-value < 0.05 was considered as a statistically significant difference between groups.

The results showed that there is a statistically difference between the groups "women" and "men" for samples of citrate stored < 2 hours before freezing, and that all the metabolites most likely are stabile with storage ≥ 2 hours before freezing. Yet it looks like that the results are largely dependent of the values included in the different groups, and that variations found between samples probably are bigger than the effects of sample storage.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Summary	III
Innledning med problemstilling	1
1. Teori	3
<i>1.1 Metabolomikk</i>	3
1.1.1 Urinmetabolomikk	4
1.1.2 Analysemetoder for urinmetabolomikk	5
1.1.3 Usikkerhet ved målemetoden.....	7
1.1.4 Screening for metabolske sykdommer i urin	10
<i>1.2 Urinprøver</i>	11
1.2.1 Kvalitetssikring ved analyse av urinprøver	12
1.2.2 Normalisering av metabolitter i urin.....	13
1.2.3 Holdbarhetsstudie på urinprøver.....	13
2. Materiale og metode	15
<i>2.1 Beskrivelse av datamaterialet</i>	15
Prosjektdeltagere.....	15
Prøvebehandling	15
Analysering av prøver.....	16
<i>2.2 Normalisering (justering) av datamaterialet</i>	16
<i>2.3 Gruppering av datamaterialet</i>	17
<i>2.4 Valg av statistiske tester</i>	18
<i>2.5 Litteratursøk</i>	18
3. Resultater	19
<i>3.1. Resultater fra undersøkelse av metabolittene ved normalisering mot kreatinin</i>	19
<i>3.2 Resultater fra undersøkelse av metabolittene ved normalisering mot totalspektrum</i>	21
<i>3.3 Resultater for lagringsinstabilitet</i>	23
4. Diskusjon med konklusjon	24
<i>4.1 Drøfting av metodevalg</i>	24
<i>4.2 Drøfting av resultater</i>	28
Undersøkelse av om hvorvidt det er signifikante forskjeller mellom grupper	28
Undersøkelse av lagringsinstabilitet av metabolittene.....	29
<i>4.3 Konklusjon</i>	31
5. Referanser	32
6. Vedlegg	35
<i>Vedlegg 1: Rådata/datamateriale</i>	35
<i>Vedlegg 2: Gruppering av metabolitter (kreatininjusterte) med standardavvik og middelveidier</i>	37
V2.1 Alanin.....	37
V2.2 Citrat	41
V2.3 Glysin.....	45
V2.4 Hippurate	49

V2.5 Trigonelline.....	53
<i>Vedlegg 3: Informasjon om holdbarhetsstudier</i>	<i>57</i>
<i>Vedlegg 4: Grafisk fremstilling av resultater</i>	<i>60</i>
<i>Vedlegg 5: Psoriasis og psoriasisartritt.....</i>	<i>61</i>

Innledning med problemstilling

Det jobbes stadig med å finne nye biomarkører som kan være til hjelp når man skal utarbeide diagnoser eller prognoser. (1) Biomarkører finnes blant annet i form av proteiner og peptider, og metabolitter, biokjemiske komponenter, kan brukes som biomarkører. (2) Metabolitter kan detekteres i biologiske væsker, for eksempel blod og urin, og kan brukes som biomarkører eller gi forbedret forståelse for tilstander og sykdommer på biologisk nivå. (3)

Institutt for sirkulasjon og billedbehandling (ISB) ved NTNU og St. Olavs hospital samarbeider i et større forskningsprosjekt om å etablere en biobank med urinprøver fra frivillige friske og fra pasienter med psoriasis og psoriasisartritt. (Se Vedlegg 5 for mer informasjon om psoriasis og psoriasisartritt.) En del av forskningsprosjektet er å analysere metabolitter i urinprøvene ved hjelp av analysemetoden magnetisk resonans (MR)-spektroskopi. Det er etablert egne protokoller for prøveopparbeidelse og analysering. Urinprøvene samles inn under standardiserte forhold. (4) Fordi urin er et ultrafiltrat av blodplasma kan urin benyttes til å vurdere og overvåke kroppens homeostase og enkelte metabolske sykdomsprosesser. (5) Forskningsprosjektet skal sammenlikne metabolittprofilen i urinprøver fra friske kontroller og fra pasienter. Målet er å identifisere biomarkører som korrelerer med type sykdom og aktivitet av sykdom. (6) ISB ønsker å undersøke i hvilken grad lagringsbetingelser kan påvirke måleresultatet av metabolitter i urinprøver, noe som danner grunnlaget for denne bacheloroppgaven.

Denne bacheloroppgaven dreier seg om å beregne lagringsinstabilitet av metabolittene alanin, citrat, glysin, hippurate og trigonelline i urin, samt undersøke i hvilken grad man kan identifisere signifikante forskjeller av metabolittkonsentrasjoner mellom ulike donorgrupper. Konsentrasjonen av metabolitter i urin påvirkes av ulike faktorer, blant annet kjønn, alder, prøvetaking og -behandling. (7) Det er kjent at kvinner har høyere konsentrasjon av citrat i urin enn menn, og at de under 40 år har lavere konsentrasjon av trigonelline enn de over 40 år. Enkelte metabolitter er i liten grad påvirket av oppbevaring og lagring, for eksempel glysin. (8) Alanin og hippurate er tatt med i studiet som potensielle markører for psoriatisk sykdom (9), og det er derfor interessant å se hvordan lagringsforhold påvirker konsentrasjonene.

Metabolittene kan analyseres ved bruk av en tilgjengelig metode: MR-spektroskopi. I forbindelse med epidemien av viruset SARS-CoV-2 (covid-19-sykdommen) i Norge våren

2020, ble NTNU stengt og innhenting av prøvematerialet fra donorer kunne ikke utføres. Etter oppstart ble bacheloroppgaven derfor endret til en analytisk oppgave som baseres på tidligere innhentede data. Hver donor har avlevert kun én prøve, og det har ikke vært under kontrollerte forhold. I denne oppgaven beregnes instabiliteten for fem metabolitter i urin.

For kvantitativ analyse av kjemiske målestoffer i urin er det anbefalt å analysere en representativ prøve av personens totale diurese, som er urin samlet i løpet av 24 timer. (5) I datamaterialet vi skulle behandle, var urinprøvene samlet fra frivillige givere. Urinprøvene var tatt på tilfeldige tidspunkt på dagen, og oppbevart i varierende tid fra 30 minutter til over 20 timer, før prøven ble tatt til analysert eller fryst ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. (4) En utfordring ved kvantitativ analyse av «spot»-urin, er urinens fortynningsgrad, og flere metoder finnes for å korrigere for dette. (5)

Følgende problemstilling ble valgt for oppgaven: I hvilken grad er metabolittene alanin, citrat, glysin, hippurate og trigonelline i urin instabile ved lagring, og i hvilken grad kan man identifisere signifikante forskjeller av metabolittkonsentrasjoner mellom ulike donorgrupper.

1. Teori

1.1 Metabolomikk

Den kjemiske prosessen som foregår i en levende organisme eller celle som er nødvendig for å opprettholde liv, kalles metabolisme. En metabolitt er en biokjemisk komponent av lavmolekylær eller middels molekylær vekt som inngår i metabolismen. Metabolomet representerer de totale molekylære forandringene. Dette formes av det store nettverket av metabolske reaksjoner som finner sted, hvor en reaksjon kan føre til en annen reaksjon og så videre. Metabolomikk er dermed studiet av metabolomet; kvantifisering og karakterisering av metabolitter etter struktur, funksjon og dynamikk av en organisme eller biologisk system. (2) Mer konkret er metabolomikk «et systematisk studium av unike kjemiske fingeravtrykk som spesifikke cellulære prosesser etterlater». (10)

Metabolomikk blir i større og større grad benyttet i mange typer biologisk og bioteknologisk forskning; forskning på biokjemi hos mennesker, dyr og planter, forskning på medikamenter og biomarkører, toksikologi, ernæring og kontroll av mat blant annet. Man har funnet at det kan benyttes til å finne biomarkører relatert til sykdommer som for eksempel Alzheimers sykdom og diabetes type to. Man kan si at metabolomikk sammen med annen type biologisk informasjon man får fra gener, transkripter og proteiner gir en større forståelse av cellebiologi, fysiologi og medisin. Per i dag kan man analysere kroppsvæsker både fra dyr og mennesker, som for eksempel urin, blodserum og -plasma, i tillegg til vev og celler. Andre ting som kan analyseres er blant annet plantevev og -ekstrakter, modellorganismer som *C. elegans*, nematoder, og bakterier. (2)

Innen metabolomikk finnes det to måter å utføre det på: målrettet («targeted») metabolomikk eller ikke-målrettet («untargeted») metabolomikk. Målrettet metabolomikk benyttes når man er ute etter å finne en spesifikk metabolitt eller en liten gruppe av disse. Det er som regel i forskningssammenheng, gjerne hypotesedrevet forskning. Fordelene med å benytte målrettet metabolomikk er spesifisitet, høy gjennomstrømming av prøver, og kvantitativ reproduserbarhet. (2)

Ved bruk av ikke-målrettet metabolomikk undersøker man den relative konsentrasjonen av metabolitter, og det kalles gjerne også for metabolsk profilering. Man får da produsert et statisk bilde av det biologiske systemets biokjemi, fysiologiske status og hvordan

påvirkningen av miljøet rundt har vært. I motsetning til ved målrettet metabolomikk blir det produsert veldig store og komplekse mengder med data, og disse kan det være vanskelig å tolke. Da vil det være lurt med et godt eksperimentelt design, hvor man har satt målene til eksperimentet på forhånd. (2)

1.1.1 Urinmetabolomikk

Urinmetabolomikk er et relativt nytt felt innen bruken av ikke-invasive biomarkører. Biomarkører kan oppdage små metabolske avvik, som kan skyldes en spesifikk sykdom eller tilstand. Urin er lett å samle opp og har høy konsentrasjon av metabolitter, sammenliknet med andre kroppsvæsker. Dermed kan urinmetabolomikk fungere godt til å finne ubalanser i kroppens biokjemiske tilstand. (11)

I motsetning til plasma, som gir et «øyeblikksbilde» på kroppens metabolitter, gir urin et «gjennomsnittsbilde» av de polare metabolittene som skilles ut i varierende mengder som følge av kroppens homeostatiske kontroll. NMR-spekteret fra friske individer er oftest dominert av metabolitter som kreatinin, laktat, alanin, citrat, dimetylammin, glysin, hippurate, og trimetylammin-N-oxine (TMAO). Det er vist at diett og fysisk aktivitet før prøveinnsamling kan påvirke konsentrasjonen av disse metabolittene. For eksempel vil et måltid som inneholder fisk resultere i økt TMAO. (12)

Ved bruk av urin til metabolske analyser er det viktig at prøvematerialet blir fryst umiddelbart. Dette er for å unngå endringer i prøvematerialet som følger av kjemiske reaksjoner. Det er generelt anbefalt å unngå oppbevaringstemperaturer over 4 °C og å unngå flere fryse-/tinesykluser. (12)

Fordelene med bruk av urinmetabolomikk inkluderer rikdom av metabolitter, lave protein- og cellenivåer, og non-invasiv prøvetaking. Å monitorere enkelte metabolitter i urin har blitt en viktig måte for å detektere tidlige stadier av sykdom. (13) I biologiske væsker som urin kan man ofte finne forandringer på metabolitnivå, før de kliniske symptomene vises. Analysering av biomarkører kan derfor brukes til diagnostikk og prognostiske tester, og gi bedre forståelse av sykdommer. (11)

I studien «Investigations of the Effects of Gender, Diurnal Variation, and Age in Human Urinary Metabolomic Profiles» av Slupsky et al. ble det undersøkt om

metabolittkonsentrasjoner kan påvirkes av blant annet kjønn og alder. Studien indikerer at flere metabolitter vil ha ulike konsentrasjoner hos kvinner og menn; citrat, kreatin, kreatinin, karnitin, acetylkarnitin, aceton og fumarat er blant disse.

I samme studie ble det funnet at metabolittene karnitin, 3-hydrokxy-valerat, kreatinin, alanin og trigonelline var signifikant forskjellige mellom yngre og eldre grupper. I studien var deltagerne mellom 19 til 69 år, og de ble delt i to grupper på < 40 år og ≥ 40 år, fordi snittalderen hos både kvinner og menn var ~ 40 år. (7)

1.1.2 Analysemetoder for urinmetabolomikk

I forbindelse med metabolomikkstudier og -analyser, kan man bruke massespektroskopi (MS) eller magnetisk resonans (MR) til deteksjon av metabolitter. MS og MR er kvantitative metoder som kan brukes til å måle mengde og type kjemiske stoffer. Det er fordeler og ulemper med begge teknikkene. MS-teknologi kan detektere mange metabolitter av gangen, men krever en preanalytisk prøvebehandling hvor prøvene må ekstraheres. MR-teknologi har lavere sensitivitet og vil derfor detektere færre metabolitter, men denne teknologien krever lite prøvebehandling. Lite prøvebehandling gjør at metoden er reproduserbar og kan enkelt brukes i kombinasjon med andre metoder. (14)

Ved MR-spektroskopi plasseres prøven i et sterkt magnetfelt og bestråles med radiobølger som er spesifikk for kjernen man er ute etter å detektere, vanligvis hydrogen (^1H). Kjernene vil absorbere energien fra radiobølgene og eksiteres, og det er når de faller tilbake og avgir denne energien at det sendes ut et signal. Emisjonens frekvens vil avhenge av de kjemiske omgivelsene i metabolittene. Signalene registreres og det dannes et MR-spekter. Hver metabolitt har en bestemt struktur med spesifikk plassering av ^1H -kjerner, som resulterer i at hver metabolitt vil ha et unikt MR-spekter og kan identifiseres ut fra det. (14)

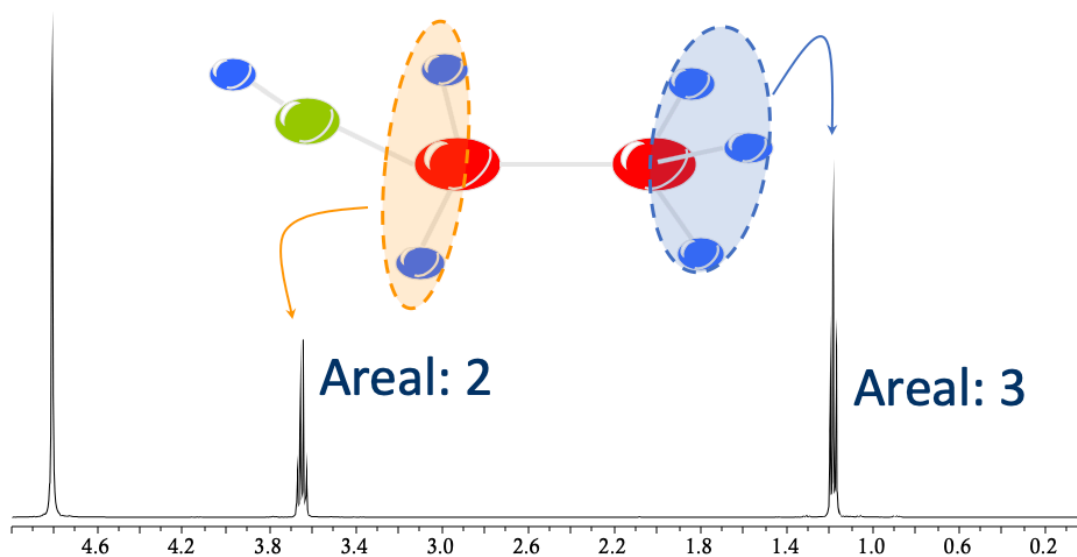
Toppene i et MR-spekter kjennetegnes ved tre ulike karakteristikker av kjernene, som utgjør signalet.

1. Areal/intensitet vil være proporsjonalt med antall kjerner som utgjør signalet, og innen ett molekyl er det helt faste forhold (som i eksempelet under, med etanol).
2. Verdien langs x-aksen er det kjemiske skiftet. Dette bestemmes av nabokjernenes elektronegativitet og forteller om kjernenes omgivelser. For eksempel vil

hydrogenkjerner som ligger nær oksygen, være lenger til venstre enn hydrogenkjerner som er ligger nær karbon.

3. Splittingsmønsteret forteller hvor mange hydrogen som er på nabokarbonet. Dersom det er 2 hydrogen på nabokarbonet, splittes signalet til 3 topper, og dersom det er 3 hydrogen på nabokarbonet splittes signalet til 4 topper.

Et eksempel på et MR-spekter av molekylet etanol kan sees i Figur 1. Her vil man alltid få to topper; en kvartett ved 3,65 ppm og en triplett ved 1,18 ppm. I tillegg vil man se en vanntopp ved 4,7 ppm, som viser hydrogenatomet som inngår i hydroksylgruppen. (15)



Figur 1: MR-spekter av etanol (C₂O₃OH) med molekylstruktur av etanol. Vanntopp ved 4,7 ppm, CH₂-gruppe ved 3,65 ppm og CH₃-gruppe ved 1,2 ppm. (Sitter, B.)

NMR-spektroskopi er et verktøy som brukes for belysning av strukturer og har evnen til å oppdage et bredt utvalg av forbindelser med forskjellige fysisk-kjemiske egenskaper. Metoden gir fullkvantitering, har ikke behov for referansestandarder, og krever minimal prøveforberedelse. En viktig begrensning for bruk av NMR-spektroskopi ved metabolomikk er lav sensitivitet og relativt lav oppløsning og mye overlappende topper. (2)

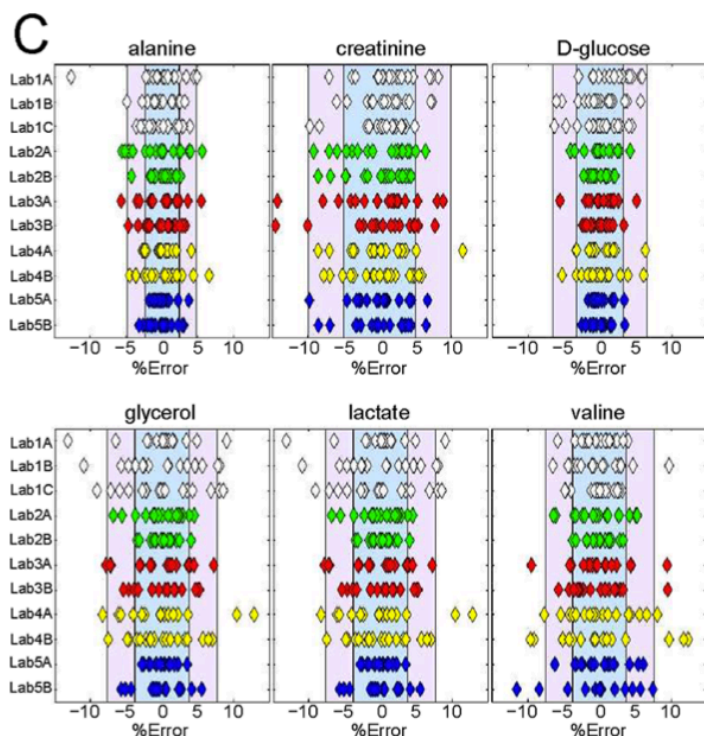
NMR-basert metabolomikk med høy gjennomstrømming av prøver har evnen til å behandle opp til 100 prøver hver dag. Dataanalyse regnes fortsatt som en flaskehals. (2)

NMR-spektre laget fra biologisk materiale som celler, vev eller biofluider, inneholder hundrevis til tusenvis av resonanser fra hundrevis av metabolitter. Det er viktig å prosessere NMR-spektre nøyaktig for å få biologisk relevant informasjon. (2)

1.1.3 Usikkerhet ved målemetoden

Et kommersielt lipoprotein-underklassestudie (Jiménez et al.) som ble brukt til kvantifisering av 105 lipoprotein-underklasser og 24 metabolitter med lav molekylærvækt fra NMR-spektre, viser til at NMR egner seg godt til analysering av metabolitter. For alle spektrometrene var den instrumentspesifikke variasjonen ved måling med interne kvalitetskontroller lavere enn prosenten oppgitt som kriterium for analysering av lipider. Dette indikerer god reproduserbarhet for direkte kvantifisering av lipoproteiner i serum og plasma. (16)

Blant metabolittene som var inkludert i studiet, var alanin, citrat, kreatinin og glycin, som vi finner igjen i vår oppgave. En kvalitetskontrollprøve, som utgjøres av flere prøver som er slått sammen, ble brukt for å kvantifisere de 24 metabolittene. En slik kvalitetskontrollprøve kan deles i flere alikvoter, og dermed analyseres under like forhold ved ulike MR-spektrometer og laboratorier. I Figur 2 presenteres standardavviket for seks av metabolittene, inkludert alanin, og viser verdiene oppnådd for de 11 spektrometrene for alle 20 kvalitetskontrollmålingene. De fem ulike laboratoriene som deltok i studiet, er fargekodet. (16)

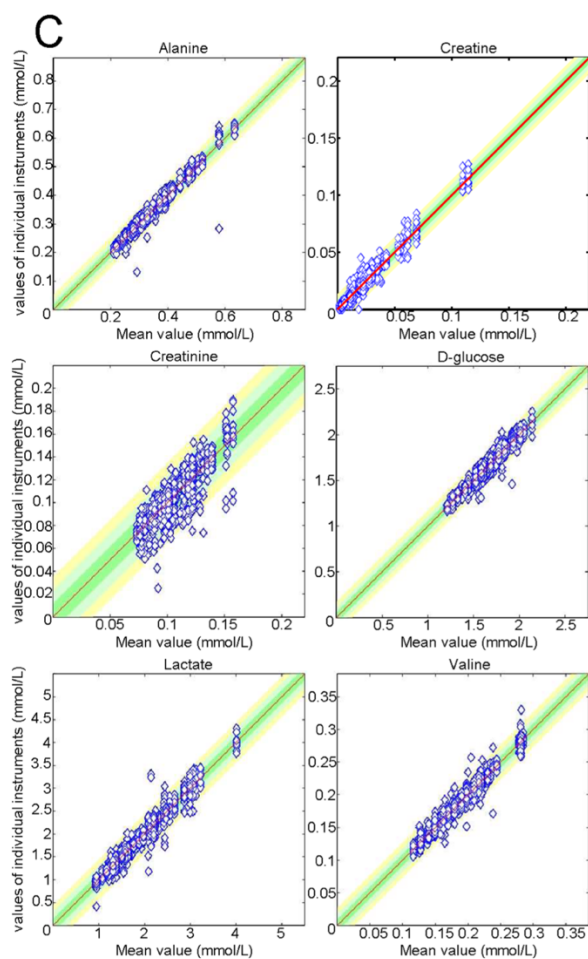


Figur 2: Instrumentspesifikk variasjon for deteksjon av småmolekylære forbindelser. Plottet representerer standardavviksverdiene for de utvalgte små molekylene som er kvantifisert ved analysering av daglig kvalitetskontroll. (16)

Variasjonskoeffisienten (CV) oppnådd ved kvantifisering av små molekyler, over 11 spektrometre var under 15 % for 20 av de 24 metabolittene som ble analysert. Studien viser at NMR er godt egnet til lipoprotein-underklasseanalyser med høy gjennomstrømming av prøver og kvantifisering av små molekyler med en god og nødvendig reproduserbarhet. (16)

Presisjonen for kvantifisering av små molekyler er presentert i Figur 3. Gjennomsnittsverdien som ble beregnet fra målte konsentrasjoner fra hver av spektrometrene for de kommersielle prøvene er plottet mot hver av verdiene: korrelasjonskoeffisienten for de småmolekylære substansene varierte fra 0,980 og en RMSE på 0,004 mmol/L for kreatinin til 0,672 med RMSE på 0,057 mmol/L for glycerol.

Når målingene oppnådd ved de 11 ulike instrumentene blir sammenliknet, finner man at 83 % av forbindelsene har en variasjonskoeffisient (CV) under 15 %, og bare én av forbindelsene overstiger 30 % CV. Dette viser at metoden for kvantifisering av små molekyler, metabolitter, har en god reproduserbarhet ved bruk av alle 11 instrumentene. (16)



Figur 3: Interlaboratorisk reproduerbarhet. Regresjonskurver der gjennomsnittsverdien av konsentrasjonen oppnådd for utvalgte små molekyler for kommersielt hentede prøver er plottet mot hver av konsentrasjonene oppnådd for hver av de 74 prøvene. Resultatene fra regresjonskurven kan ses som alanin ($R = 0,980$, $RMSE = 0,019$ mmol/L), kreatin ($R = 0,9612$, $RMSE = 0,052$ mmol/L), kreatinin ($R = 0,884$, $RMSE = 0,010$ mmol/L), glukose ($R = 0,970$, $RMSE = 0,064$ mmol/L), laktat ($R = 0,987$, $RMSE = 0,155$ mmol/L) og valin ($R = 0,930$, $RMSE = 0,018$ mmol/L). (16)

NMR er en attraktiv analysemetode på grunn av høy reproduerbarhet, enkel prøveopparbeidelse og enkel kvantifisering for ulike forbindelser med en enkelt intern standard. MR-spekteret kan forstyrres av vann, på grunn av dets sterke intensitet og at kjemisk bytting potensielt kan svekke nøyaktigheten. (17)

Reproduerbarheten og kvaliteten til NMR-analyser kan påvirkes av prøvekvaliteten, som inkluderer preanalytiske faktorer som prøveinnsamling, oppbevaring og klargjøring. For eksempel kan kjemiske nedbrytningsprosesser som oksidasjon og spalting av ustabile kjemiske forbindelser påvirke prøvesammensetningen betydelig. (4)

1.1.4 Screening for metabolske sykdommer i urin

Urin er et ultrafiltrat av blodplasmaet og vannløselige komponenter som skilles ut i urinen. Når slike stoffer er produsert i overskudd, kan det detekteres i urinen. Rutinemessig urinalyse kan gi viktig informasjon om metabolske sykdommer. For mange år siden ble mange metabolske forstyrrelser oppdaget på bakgrunn av at urin med særegen lukt eller uvanlig farge ble notert, undersøkt og beskrevet. Følgelig ble urintesting en metode for påvisning og overvåking av metabolske forstyrrelser. Disse forstyrrelsene i karbohydrat-, fett- og proteinmetabolismen varierer og karakteriseres ved økt utskillelse av et stoff som normalt finnes i urin eller utskillelse av et stoff som normalt ikke er tilstede. Fordi noen metabolske sykdommer er knyttet til livslange skadelige effekter, for eksempel intellektuelle funksjonshemninger eller degenerasjon av nervesystemet, og til og med død, er tidlig deteksjon svært viktig. (5)

Historisk har laboratoriet brukt en rekke enkle kvalitative urinscreeningstester som ga «bevis» for metabolsk sykdom. For øyeblikket blir disse «urinscreening»-testene sjeldent utført fordi 1. testene er uspesifikk og lite sensitive, 2. sykdomsforekomsten er lav med få tester som etterspørres, 3. det trengs en stor mengde tid for å opprettholde reagensene og kvalitetssikringsprogram, og viktigst, 4. bedre deteksjonsmetoder er nå tilgjengelige. (5)

1.2 Urinprøver

Urinundersøkelser har lenge vært brukt innen medisin og diagnostikk. Urinprøver kan anvendes på ulike måter, blant annet er urinmikroskopi, bakteriologiske undersøkelser og strimmeltester mye brukt. I tillegg kan man gjøre molekylærbiologiske, biokjemiske og endokrine undersøkelser på urin. Kvaliteten på urinprøver påvirkes av mange faktorer, og er ofte varierende. Det er derfor viktig med gode rutiner og standardiserte prosedyrer for prøvetaking, prøvebehandling og oppbevaring. En urinprøve som ikke oppfyller kravene vil ikke være representativ for pasientens fysiologiske tilstand. (18)

På lik linje med at blodprøveanalyser krever ulik prøvetaking, krever også enkelte urinalyser ulik prøvetaking. Ofte tar pasientene urinprøven selv, og det er derfor viktig med grundig gjennomgang av hvordan prøven skal tas. Dersom man for eksempel skal ha en urinprøve til bakteriologisk dyrkning, er det viktig å unngå kontaminering og at informasjon om prøvetaking kommer med (morgenurin, midtstråle, etc.). (19)

For å få en representativ prøve er det viktig med god hygiene og riktig prøvetaking, altså riktig utstyr og beholdere. Utstyr til urinprøver skal være rent og laget av et materiale som ikke reagerer med urinprøven. Det finnes standardiserte beholdere, både med og uten tilsetningsstoffer. Et typisk tilsetningsstoff er borsyre, som fungerer som et konserveringsmiddel. (18)

Som nevnt kan urinalyser kreve ulik prøvetaking og det er viktig at informasjonen om prøvetakingen kommer med selve prøven. Kateterurin, vaskeprøve og midtstråleurin er eksempler på begreper som omtaler prøvetakingsmetode, mens spot-urin, døgnurin og morgenurin omhandler prøvetakingstidspunkt. Morgenurin har høy konsentrasjon, og er urinen som har vært lengst i blæren. Typiske urinalyser som ønsker morgenurin er strimmeltest, mikroskopering av urinsediment, bakteriologiske undersøkelser og enkelte biokjemiske analyser. Dersom man ikke får tatt morgenurin, kan urin som har vært i blæren i to til tre timer brukes på tilsvarende måte. (18)

1.2.1 Kvalitetssikring ved analyse av urinprøver

Kvalitetssikring er et system laget for å sikre kvaliteten til laboratoriets tjenester, det vil si testresultatene. Kvalitetssikringen for et urinalyse-laboratorium har tre prinsipielle aspekter:

1. preanalytiske komponenter: prosesser som skjer før testing; 2. analytiske komponenter: aspekter som direkte påvirker testingen; og 3. postanalytiske komponenter: prosedyrer og retningslinjer som påvirker rapporteringen og tolkningen av resultatene. (5)

På grunn av viktigheten av kostnadseffektiv praksis i testbestilling, har laboratoriet en rolle i å overvåke testutnyttelsen - det vil si å unngå duplikattesting og sikre testegenskaper når det er mulig. Hvert laboratorium er unikt, og prosedyrer for å minimere og unngå unødvendig testing må tilpasses arbeidsflyten i det enkelte laboratorium. (5)

Betydningen av rask og effektiv resultatrapportering kan ikke understrekes. En forsinkelse i prøven transport og prosessering påvirker direkte prøvetidens behandlingstid (TAT). I et laboratorium defineres TAT som tiden fra mottak av prøven i laboratoriet til rapportering av resultater til et pasientpleieområde eller til et datainformasjonssystem. (5)

Teknikker for innsamling av urinprøver er forskjellige; de er ofte kontrollert av medisinsk personell utenfor laboratoriet og kan ha direkte effekt på oppnådde resultater. I tillegg kan mange fysiologiske faktorer påvirke den innsamlede urinprøven (for eksempel kosthold, trening, hydrering, medisiner), og avhengig av testen kan det være nødvendig med ulike pasientforberedelser. (5)

Prosedyren skal involvere: 1. å sørge for at to unike pasientidentifikatorer (for eksempel navn, fødselsdato, legejournal) er på rekvisisjonen og på selve prøven, og at de samsvarer; 2. evaluering av tiden fra prøvetaking og mottakelse av prøven i laboratoriet; 3. egnetheten til konservering av prøven, hvis nødvendig; og 4. akseptabiliteten av prøven (for eksempel det innsamlede volum, den anvendte beholderen, dens renslighet - ethvert bevis på fekal kontaminering). (5)

Kriterier for å avvise en urinprøve kan være: utilstrekkelig volum av urin for rekvirert(e) test(er), upassende prøvemateriale eller prøvetaking, synlig kontaminert prøve, feil urinkonserveringsmiddel, prøven er ikke riktig oppbevart for transportforsinkelser, umerket eller feilmerket prøve eller rekvisisjon, eller rekvisisjon som har mangler eller er ufullstendig.

Behandlingen av urinprøver på laboratoriet er en annen potensiell kilde for preanalytiske problemer. Urinprøver som skal rutineanalyseres, bør testes innen to timer fra prøvetaking. Dersom forsinkelser i transporten til laboratoriet eller ved mottakelse er uunngåelig, bør prøven fryses ned. Tidsbestemte urinoppsamlinger krever en skriftlig protokoll for å sikre tilstrekkelig blanding, volummåling, registrering, alikvotering og konservering - når prøvetesting skal utsettes eller analytten av interesse er ustabil. Med en skriftlig prosedyre for prøvebehandling på plass, vil alt personell utføre disse oppgavene konsekvent, og dermed eliminere unødvendige variabler. (5)

1.2.2 Normalisering av metabolitter i urin

Konsentrasjonen av metabolitter i urin avhenger av utskilt mengde metabolitt og urinvolum. Ved stort væskeinntak vil konsentrasjonen av metabolitter i urin bli lavere, og motsatt. En mulig løsning på dette, er å måle konsentrasjon av kreatinin i urinen, som et mål på urinens fortynningsgrad. Videre kan man dividere konsentrasjonen av analysert metabolitt, mot konsentrasjonen av kreatinin. Resultatet man får er justert for urinvolum, og vil da redusere variasjoner forårsaket av urinens fortynningsgrad. (20)

Innen klinisk kjemi uttrykkes retningslinjer for urinbiomarkører ofte som kreatinin-normaliserte verdier med formål om å forhindre store falske negative eller falske positive verdier. Validiteten til kreatinin-normalisering, for å redegjøre variasjoner i urinutgangsvolum, har vært motstridende. I utgangspunktet er kreatinin-normalisering bare nyttig dersom effekten av kosthold og eventuell eksisterende nyresykdom kan ignoreres, eller hvor man kan anta at kinetikken for utskillelse av den valgte biomarkøren er lik urin. (7)

1.2.3 Holdbarhetsstudie på urinprøver

Med bakgrunn i forskningsprosjektet Biomarkører for psoriasis og psoriasis artritt ønsker man å undersøke *hvordan metabolittene alanin, citrat, hippurat, trigonelline og glysin påvirkes av oppbevaring av prøve og tiden det tar før prøve fryses*. Årsaken er at ved prøveopparbeidelse i prosjektet er det en del variasjoner i når urinprøver tas, hvor lenge de oppbevares før de fryses og analyseres, og ved hvilke temperaturer de oppbevares før analysering. (6)

Det er flere faktorer som spiller inn på sammensetningen av urin, som kjønn, alder, tid på dagen prøven tas, og hvordan prøven behandles etter at den er avgitt. (7) Ideelt sett vil prøver avgis fastende om morgenen (morgenurin) og fryses innen én time. Andre ganger vil prøver avgis senere på dagen med minst to timer siden siste måltid eller drikke, unntatt inntak av vann. Enkelte prøver vil stå kjølig over natt ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$), og det betyr at det går over 24 timer fra en prøve tas til den fryses. (6)

Flere av holdbarhetsstudiene som er utført innen metabolomikk tidligere vurderer endringer i forhold til det spesifikke målet for studiet. Det vil si at man har undersøkt om variasjonene som oppstår på grunn av ulik prøvebehandling endrer klassifiseringen. Ofte benyttes hele spekter enten som rådata i prinsipalkomponent-analyser eller i modellering med for eksempel PLS-DA for klassifisering. (21) Ett eksempel er en studie gjort av Barton et al. hvor det ble undersøkt effekt av oppbevaring og analytisk reproduserbarhet ved bruk av NMR-analyse. Her analyserte man to prøver fra hver donor, hvor den ene prøven ble oppbevart ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 24 timer før analyse. Der konkluderes det med at oppbevaring av urin i opptil 24 timer ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ikke påvirker metabolittene. (22) Ideen for holdbarhetsstudien er å få en mer generell og kvantitativ vurdering av hvordan urinprøver påvirkes av lagring på ulike tidspunkt. (21)

Forsøksdeltagerne i denne holdbarhetsstudien på urinprøver skulle deles inn i to grupper; menn > 45 år og kvinner mellom 18-25 år. Årsaken til at det er ønskelig med to ulike grupper er at flere metabolitter har kjente forskjeller mellom kjønn og ulike aldere. Da kunne man undersøkt om det var mulig å detektere disse forskjellene for metabolittene ved ulik oppbevaring, i tillegg til å undersøke holdbarhet for dem.

2. Materiale og metode

2.1 Beskrivelse av datamaterialet

Datamaterialet i denne oppgaven er kvantifiserte metabolitter i urinprøver i et pågående prosjekt ved NTNU/St. Olavs hospital hvor det letes etter biomarkører for psoriasis og psoriasis artritt.

Prosjektdeltagere

Prosjektet har samlet inn prøver fra 63 prosjektdeltagere. Aldersspennet på prosjektdeltagerne er fra 16 til 71 år, og kjønnsfordelingen er 39 kvinner og 24 menn. Informasjon om prosjektdeltagerne finnes i Tabell 1.

Tabell 1: Prosjektdeltagere inndelt i kvinner og menn, med undergrupper unge og eldre, og kort tid (< 2 t) og lang tid (≥ 2 t) før frys.

Gruppe		Antall (n)	
		Kvinner (n = 39)	Menn (n = 24)
Alder	Unge (≤ 40 år)	20	10
	Eldre (> 40 år)	19	14
Lagring	Kort tid før frys (< 2 t)	19	12
	Lang tid før frys (≥ 2 t)	20	12

Prøvebehandling

Spot-urinprøver tatt fastende på morgenen ble samlet inn og satt i kjøleskap (4 °C) etter prøvetaking. Prøvene ble overført til tre alikvoter, og satt i fryser med temperatur på -80 °C, så raskt det lot seg gjøre. Ved optimale forhold er prøvene morgenuriner som fryses innen en time. Dette datamaterialet har et spenn på lagringstid før frys fra 30 minutter til over 20 timer.

Før NMR-analysering ble prøvene tint i romtemperatur og sentrifugert i 5 minutter, ved 12 121 g ved 4 °C. 540 μ L av supernatanten ble blandet med 60 μ L buffer med pH 7,4, som bestod av 1,5 mM KH_2PO_4 i tungtvann (D_2O) og 0,1 % trimetylsilylpropionat (TSP), med en

pH 7,4. (4) Buffer med natriumazid hindrer bakterievekst og bidrar til å normalisere pH-nivået i prøvene. Urinløsningene ble deretter overført til 5 mm NMR-rør. (14)

Analysering av prøver

NMR-analysene ble utført på et Bruker Avance III Ultrashield Plus 600 MHz spektrometer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany) utstyrt med en 5 mm QCI Cryoprobe. Prøvehåndtering og datainnsamling ble automatisk utført ved bruk av SampleJet-prøvebytter og Icon-NMR på Topspin 3.5 (Bruker BioSpin). Prøvene ble holdt ved 4 °C i sampleJet under opptaket. NMR-spektrene ble tatt opp med undertrykking av vannsignalet. (4) Opptaket tok omtrent ti minutter.

Totalt 50 urinmetabolitter ble automatisk kvantifisert ved bruk av Bruker B.I.Quant-URTM-metoden. (4) Fem av disse metabolittene undersøkes i denne oppgaven; alanin, citrat, glysin, hippurate og trigonelline.

2.2 Normalisering (justering) av datamaterialet

I denne oppgaven valgte vi å normalisere datamaterialet både mot kreatinin og mot totalspektrumet, for å få konsentrasjoner som er justert for urinvolum. Ved å normalisere konsentrasjonene før man utfører statistiske beregninger, vil man korrigere for variasjoner forårsaket av urinens fortynningsgrad.

Normalisering mot kreatinin gjøres ofte innen klinisk kjemi for å unngå store falske negative eller falske positive verdier, da kreatinin er et mål på urinens fortynningsgrad. For å få kreatininjusterte verdier ble konsentrasjoner av de analyserte metabolittene dividert på konsentrasjoner av kreatinin fra samme donor.

I studier av metabolomikk er normalisering mot totalspektrumet (arealet under kurven) ofte brukt, og det anses som en robust normaliseringsmetode. For å få verdier normalisert mot totalspektrumet ble konsentrasjonen av de analyserte metabolittene dividert på totalkonsentrasjonen av alle målte metabolitter fra samme donor. Ved normalisering av dette datamaterialet mot totalspektrumet ble det valgt å inkludere verdier oppgitt som «mindre enn»

(<). Avgjørelsen var basert på at veldig mange verdier var oppgitt som «<», og at man kunne risikere å bruke et ikke-representativt totalspektrum til videre beregninger dersom dette ikke ble gjort.

2.3 Gruppering av datamaterialet

Datamaterialet inneholdt konsentrasjonsverdier for 50 metabolitter fra 63 ulike donorer. Fem metabolitter skulle undersøkes; alanin, citrat, glysin, hippurate og trigonelline. Verdier oppgitt som «mindre enn» og ekstremverdier ble fjernet, som resulterte i følgende antall verdier: alanin: $n = 54$, citrat: $n = 56$, glysin: $n = 55$, hippurate: $n = 43$, og trigonelline: $n = 33$.

Det ble valgt å først dele datamaterialet inn i to grupper; prøver oppbevart < 2 timer før frys og prøver oppbevart ≥ 2 timer før frys. Deretter ble datamaterialet for hver av disse gruppene delt inn i undergrupper; kvinner og menn, og unge og eldre. På grunn av antall tilgjengelige verdier ble det valgt å bruke $n = 10$ for undergruppene der det var mulig. Det ble valgt å bruke de samme donorene ved undersøkelse av datamaterialet normalisert mot totalspektra som mot normalisering mot kreatinin.

Det var stor variasjon i hvor mange donorer som hadde resultater på de ulike metabolittene etter fjerning av ekstremverdier og verdier oppgitt med «mindre enn»; for eksempel hadde citrat 56 donorer, mens trigonelline hadde 33 donorer. Dette påvirket hvilke donorer som ble tatt med i undergruppene på $n = 10$. Dersom det var flere donorer tilgjengelig enn nødvendig, ble donorene som ville gi størst forskjell valgt ut; de 10 yngste vs. de 10 eldste, og de 10 prøvene som hadde kortest tid før frys vs. de 10 prøvene som hadde lengst tid til frys.

For metabolittene alanin, citrat og glysin var det nok verdier til å få $n = 10$ i gruppene unge og eldre, mens det for hippurate og trigonelline ble valgt å skille donorer slik: unge (≤ 40 år) og eldre (> 40 år). Årsaken var at det ble observert at for de tre første metabolittene lå medianalder på ~ 40 år. Enkelte grupper fikk dermed $n = < 10$.

2.4 Valg av statistiske tester

Etter normalisering mot både kreatinin og totalspektrum, samt inndeling i grupper, ble rådata behandlet med beregning av gjennomsnitt, standardavvik og variasjonskoeffisient (%CV) (Microsoft Excel for Mac 2020, Versjon 16.36 (20041300), Microsoft Corporation, USA). Resultatene ved undersøkelse av dataene for citrat (kvinner og menn) og trigonelline (alder) ble fremstilt grafisk i Figur 4 og Figur 5 (normalisert mot totalspektrumet).

Tosidig t-test ble brukt for å sammenligne gruppene for alle metabolittene (Tabell 2 , Tabell 3 og Tabell 4). F-test ble benyttet for å avgjøre hvor det skulle benyttes t-test for to utvalg med lik varians og hvor det skulle benyttes t-test for to utvalg med ulik varians. P-verdi $< 0,05$ vurderes som statistisk signifikant forskjell mellom grupper.

2.5 Litteratursøk

I denne bacheloroppgaven har det hovedsakelig blitt benyttet litteratur anbefalt av faglig veileder og litteratur fra pensumlisten ved bioingeniørutdanningen ved NTNU (Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet), Trondheim.

For å finne andre relevante artikler og tidligere forskning til oppgaven ble søkemotorene PubMed og Google Scholar benyttet. Noen av søkeordene som ble brukt var «metabolomics», «urine metabolomics», «NMR Spectroscopy» og «psoriasis».

3. Resultater

Ved undersøkelse av metabolittene normalisert både mot kreatinin og totalspektrumet ble det beregnet gjennomsnittsverdier, standardavvik og variasjonskoeffisienter (%CV) for alle gruppene.

3.1. Resultater fra undersøkelse av metabolittene ved normalisering mot kreatinin

Tabell 2 viser resultatet ved undersøkelse av alle metabolittene med beregnede p-verdier ved sammenligning av grupper. P-verdiene som ble funnet varierer fra 0,01 til 0,98, og nesten samtlige p-verdier viser at eventuelle forskjeller mellom grupper ikke kan regnes som signifikante. Rådata fra undersøkelsene finnes i Vedlegg 1 og Vedlegg 2 (gruppering av metabolitter).

Variasjoner (CV) i undersøkelsene varierer fra 24 til 86 %, og det er ingen trend til forskjeller basert på tid til frys.

Det ble funnet at det er mer citrat i urinprøver fra kvinner enn menn, men bare signifikant forskjell (p-verdi < 0,05) for prøver oppbevart < 2 timer før de ble frosset. For trigonelline ble det ikke funnet noen signifikant forskjell mellom aldersgrupper uavhengig av oppbevaringstid før frys.

Tabell 2: Tabellen viser gjennomsnittsverdier med standardavvik og variasjonskoeffisient (CV) for metabolittene (kreatininjusterte) sammenlignet med t-test mellom kvinner og menn, og mellom unge og eldre.

Meta- bolitt	Tid før frys (timer)	Undergruppe	Gjennomsnitt	Standardavvik	p-verdi	CV	
Alanin	< 2	Unge (n = 10)	0,024	0,0085	0,58	38 %	
		Eldre (n = 10)	0,022	0,0084		36 %	
	≥ 2	Unge (n = 10)	0,023	0,0084	0,32	35 %	
		Eldre (n = 10)	0,031	0,022		71 %	
	< 2	Kvinner (n = 10)	0,025	0,010	0,93	40 %	
		Menn (n = 9)	0,025	0,015		60 %	
	≥ 2	Kvinner (n = 10)	0,021	0,0087	0,28	45 %	
		Menn (n = 10)	0,028	0,019		68 %	
	Citrat	< 2	Unge (n = 10)	0,26	0,15	0,75	58 %
			Eldre (n = 10)	0,24	0,091		38 %
≥ 2		Unge (n = 10)	0,24	0,11	0,14	46 %	
		Eldre (n = 10)	0,32	0,12		38 %	
< 2		Kvinner (n = 10)	0,35	0,15	0,089	43 %	
		Menn (n = 10)	0,19	0,076		42 %	
≥ 2		Kvinner (n = 10)	0,26	0,11	0,51	42 %	
		Menn (n = 10)	0,22	0,14		64 %	
Glysin		< 2	Unge (n = 10)	0,16	0,10	0,071	63 %
			Eldre (n = 10)	0,089	0,038		50 %
	≥ 2	Unge (n = 10)	0,11	0,092	0,63	82 %	
		Eldre (n = 9)	0,091	0,040		44 %	
	< 2	Kvinner (n = 10)	0,15	0,11	0,094	73 %	
		Menn (n = 8)	0,084	0,040		50 %	
	≥ 2	Kvinner (n = 10)	0,077	0,043	0,98	50 %	
		Menn (n = 10)	0,077	0,041		50 %	
	Hippurate	< 2	Unge (n = 10)	0,41	0,3	0,53	73 %
			Eldre (n = 10)	0,48	0,15		31 %
≥ 2		Unge (n = 7)	0,34	0,19	0,15	56 %	
		Eldre (n = 10)	0,54	0,31		57 %	
< 2		Kvinner (n = 10)	0,51	0,28	0,33	55 %	
		Menn (n = 6)	0,38	0,17		45 %	
≥ 2		Kvinner (n = 10)	0,47	0,22	0,80	47 %	
		Menn (n = 9)	0,44	0,29		66 %	
Trigonelline		< 2	Unge (n = 4)	0,054	0,014	0,36	26 %
			Eldre (n = 9)	0,067	0,025		37 %
	≥ 2	Unge (n = 8)	0,060	0,020	0,15	33 %	
		Eldre (n = 10)	0,094	0,065		69 %	
	< 2	Kvinner (n = 9)	0,062	0,025	0,83	40 %	
		Menn (n = 4)	0,065	0,018		28 %	
	≥ 2	Kvinner (n = 10)	0,062	0,015	0,21	24 %	
		Menn (n = 8)	0,098	0,074		76 %	

3.2 Resultater fra undersøkelse av metabolittene ved normalisering mot totalspektrum

Det ble brukt t-test for å sammenligne gruppene unge og eldre, og kvinner og menn. Tabell 3 viser resultatet ved undersøkelse av alle metabolittene med beregnede p-verdier ved sammenligning av grupper. P-verdiene som ble funnet varierer fra 0,01 til 0,95, og nesten samtlige p-verdier viser at eventuelle endringer fra utgangsverdi ikke kan regnes som signifikante. Rådata fra undersøkelsene finnes i Vedlegg 1.

Variasjoner (CV) i undersøkelsene varierer fra 21 til 80 %, og det er ingen trend til forskjeller basert på tid til frys.

Det ble funnet at det er mer citrat i urinprøver fra kvinner enn menn, men bare signifikant forskjell ($p\text{-verdi} < 0,05$) for prøver oppbevart < 2 timer før de ble frosset. For trigonelline ble det ikke funnet noen signifikant forskjell mellom aldersgrupper uavhengig av oppbevaringstid før frys. Gjennomsnittsverdier for kvinner og menn for citrat, samt unge og eldre for trigonelline, er fremstilt grafisk i Vedlegg 4.

Tabell 3: Tabellen viser gjennomsnittsverdier med standardavvik og variasjonskoeffisient (CV) for metabolittene (normalisert mot totalspektrumet) sammenlignet med t-test mellom kvinner og menn, og mellom unge og eldre.

Meta- bolitt	Tid før frys (timer)	Undergruppe	Gjennomsnitt	Standardavvik	p-verdi	CV	
Alanin	< 2	Unge (n = 10)	0,0027	0,00092	0,54	34 %	
		Gamle (n = 10)	0,0024	0,0010		39 %	
	≥ 2	Unge (n = 10)	0,0026	0,00087	0,94	33 %	
		Gamle (n = 10)	0,0027	0,0014		53 %	
	< 2	Kvinner (n = 10)	0,0028	0,0011	0,95	40 %	
		Menn (n = 9)	0,0028	0,0017		59 %	
	≥ 2	Kvinner (n = 10)	0,0023	0,00092	0,64	40 %	
		Menn (n = 10)	0,0025	0,0010		39 %	
	Citrat	< 2	Unge (n = 10)	0,029	0,016	0,70	54 %
			Gamle (n = 10)	0,027	0,010		36 %
≥ 2		Unge (n = 10)	0,027	0,012	0,50	44 %	
		Gamle (n = 10)	0,030	0,013		41 %	
< 2		Kvinner (n = 10)	0,038	0,016	0,013	42 %	
		Menn (n = 10)	0,022	0,0084		38 %	
≥ 2		Kvinner (n = 10)	0,030	0,012	0,10	40 %	
		Menn (n = 10)	0,021	0,011		52 %	
Glysin		< 2	Unge (n = 10)	0,017	0,011	0,069	62 %
			Gamle (n = 10)	0,010	0,0043		43 %
	≥ 2	Unge (n = 10)	0,012	0,0093	0,34	79 %	
		Gamle (n = 9)	0,0086	0,0043		50 %	
	< 2	Kvinner (n = 10)	0,017	0,012	0,11	70 %	
		Menn (n = 8)	0,097	0,0046		48 %	
	≥ 2	Kvinner (n = 10)	0,0085	0,0046	0,66	54 %	
		Menn (n = 10)	0,0076	0,0043		56 %	
	Hippurate	< 2	Unge (n = 10)	0,046	0,031	0,56	68 %
			Gamle (n = 10)	0,053	0,015		29 %
≥ 2		Unge (n = 7)	0,039	0,021	0,32	54 %	
		Gamle (n = 10)	0,053	0,033		61 %	
< 2		Kvinner (n = 10)	0,056	0,030	0,40	54 %	
		Menn (n = 6)	0,044	0,018		42 %	
≥ 2		Kvinner (n = 10)	0,051	0,021	0,60	41 %	
		Menn (n = 9)	0,044	0,031		69 %	
Trigonelline		< 2	Unge (n = 4)	0,0062	0,0017	0,38	27 %
			Gamle (n = 9)	0,0075	0,0027		36 %
	≥ 2	Unge (n = 8)	0,0068	0,0022	0,33	33 %	
		Gamle (n = 10)	0,0090	0,0066		73 %	
	< 2	Kvinner (n = 9)	0,0069	0,0027	0,66	40 %	
		Menn (n = 4)	0,0076	0,0020		26 %	
	≥ 2	Kvinner (n = 10)	0,0069	0,0014	0,36	21 %	
		Menn (n = 8)	0,0095	0,0076		80 %	

3.3 Resultater for lagringsinstabilitet

Ved undersøkelse av lagringsstabilitet ble det beregnet gjennomsnittsverdier og standardavvik for alle metabolittene (normalisert mot kreatinin) når datamaterialet er inndelt i grupper etter hvor lenge prøvene har blitt oppbevart før frys (< 2 timer og ≥ 2 timer).

Tabell 4 viser resultatene for alle metabolittene når er inndelt i grupper etter hvor lenge prøvene har blitt oppbevart før frys. Det ble ikke funnet noe signifikant forskjell mellom gruppene (p -verdi $> 0,05$). Rådata fra analysene finnes i Vedlegg 1.

Variasjoner (%CV) i undersøkelsene varierer fra 35 til 118 %, og det kan se ut som at %CV er litt lavere hos prøver som er oppbevart < 2 timer før frys.

Tabell 4: Tabellen viser gjennomsnittsverdier med standardavvik og variasjonskoeffisient (CV) for alle metabolitter (kreatininjusterte) inndelt etter tid med oppbevaring før frys. Gjennomsnittsverdiene ble sammenlignet med t-test mellom lagring < 2 timer og ≥ 2 timer før frys.

Metabolitt	Tid før frys (timer)	Gjennomsnitt	Standardavvik	p-verdi	CV
Alanin	< 2 (n = 26)	0,025	0,012	0,86	48 %
	≥ 2 (n = 28)	0,025	0,015		60 %
Citrat	< 2 (n = 28)	0,28	0,13	0,62	46 %
	≥ 2 (n = 28)	0,26	0,12		46 %
Glysin	< 2 (n = 25)	0,12	0,077	0,80	67 %
	≥ 2 (n = 30)	0,11	0,13		118 %
Hippurate	< 2 (n = 22)	0,45	0,22	0,77	49 %
	≥ 2 (n = 21)	0,43	0,26		60 %
Trigonelline	< 2 (n = 13)	0,063	0,022	0,32	35 %
	≥ 2 (n = 20)	0,076	0,050		66 %

4. Diskusjon med konklusjon

4.1 Drøfting av metodevalg

Denne bacheloroppgaven er en analytisk oppgave som dreier seg om å beregne lagringsinstabilitet av metabolittene alanin, citrat, glysin, hippurate og trigonelline i urin. Da den eksperimentelle innhenting av måledata ikke kunne utføres, baserte analysen seg på tidligere innhentede data fra MR-spektroskopi. I tillegg blir det undersøkt hvorvidt det er signifikante forskjeller mellom grupper i datamaterialet.

Datamaterialet i bacheloroppgaven bestod av 63 konsentrasjonsverdier for hver av 50 metabolitter. Urinprøvene fra donorene ble oppbevart i ulik tid (fra 30 minutter til over 20 timer) før de ble satt i -80 °C fryser. Hver donor hadde avlevert kun én urinprøve hver. Det var ikke alikvoter eller «nullprøver» tilgjengelig. Det ble derfor valgt å dele datamaterialet inn i grupper og undergrupper basert på tid før frys, for å så undersøke om man klarte å finne forskjeller mellom undergrupper (kvinner og menn, og unge og eldre) ved de ulike oppbevaringstidene.

I utgangspunktet ville det vært ideelt å bruke kun kontroller, og utelate personer med psoriatisk sykdom, før man eventuelt delte inn i undergrupper. Dette fordi fire av metabolittene har kjent lavere verdier hos personer med psoriatisk sykdom. (9) Dette ble det valgt å ikke gjøre, da det var en del færre kontroller i forhold til prøver fra personer med psoriatisk sykdom. Det ville trolig gjort det vanskelig å få nok verdier i undergruppene.

En faktor som også spiller inn ved analysering av urinprøver er biologisk variasjon. Biologisk variasjon, både intra- og interindividuell biologisk variasjon, vil kunne gi enkelte unormalt høye eller lave verdier som vil påvirke gjennomsnittsverdi og standardavvik for en gruppe. (23) I denne oppgaven bestod gruppen donorer både av friske kontroller og personer med psoriatisk sykdom. Det er kjent at disse gruppene har ulikt referanseområder for de fleste av de metabolittene som ble undersøkt. Dersom holdbarhetsstudien hadde blitt utført som planlagt, med alikvoter fryst ned på ulike tidspunkt og oppbevart ved ulike temperaturer, ville man kunne sett på den relative utviklingen til hver prøve, uavhengig av konsentrasjonen på «nullprøven». Ved en slik gjennomføring ville biologisk variasjon og eventuell psoriatisk sykdom ikke påvirket resultatet i vesentlig grad.

Det ble valgt først å dele datamaterialet inn i to grupper; prøver oppbevart < 2 timer før frys og prøver oppbevart ≥ 2 timer før frys. 2 timer ble valgt som grense mellom gruppene fordi det er realistisk å anta at det vil ta opptil to timer før en urinprøve settes i $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -fryser i de medisinske laboratoriene. Av praktiske årsaker vil prøven derfor fortsatt kunne regnes som en «ikke lagret» prøve. Av de 63 prøvene var prøver fra 31 donorer oppbevart < 2 timer før frys og prøvene fra de resterende 32 donorer var oppbevart ≥ 2 timer før frys. Dette ga to tilnærmet like store donorgrupper.

Ved inndeling i undergrupper ble det bestemt at hver undergruppe skulle inneholde ti konsentrasjonsverdier ($n = 10$) der det var mulig. Generelt er det slik at jo flere prøver som inkluderes i holdbarhetsforsøk, desto smalere og sikrere blir konfidensintervallet for målt gjennomsnittsverdi. Som regel holder det med 10-30 prøver, men av hensyn til enkeltverdier anbefales ikke bruk av < 20 prøver. Fordi ekstremverdier i denne bacheloroppgaven ble fjernet før inndeling i undergrupper, ble det antatt at det var greit å benytte $n = 10$.

Antall tilgjengelige donorer var en viktig, og begrensende, faktor ved bestemmelse av størrelsen på undergruppene. For noen undergrupper var det flere verdier tilgjengelig enn $n = 10$, og da ble ytterpunktene valgt ut. Bakgrunnen for det er at om man bruker ytterpunktene kan man med større sannsynlighet klare å oppdage en eventuell signifikant forskjell mellom gruppene, da man eliminerer de donorene som ligger nærmest hverandre i enten tid (ved gruppering av kjønn) eller alder. Da kan man også med større sikkerhet si at det eventuelt ikke er en signifikant forskjell mellom gruppene om det blir resultatet.

For noen undergrupper av enkelte metabolitter var det ikke nok tilgjengelige verdier til at gruppene fikk $n = 10$. Dette gjaldt for eksempel flere undergrupper ved undersøkelse av metabolittene hippurate og trigonelline. Antall verdier (n) for hver undergruppe ble oppgitt i resultattabellene (Tabell 2 og Tabell 3). Beregninger fra grupper med gjennomsnittsverdier med $n < 10$ har en større usikkerhet fordi utvalget blir mindre representativt, og det er en svakhet det er viktig å være bevisst ved tolkning av resultatene.

Et annet moment det er viktig å være bevisst ved tolkning av resultatene er at det finnes en ikke-kontrollerbar tidsfaktor det må tas hensyn til; det er ikke registrert hvor lenge prøven har stått i $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ etter tining før analysering. Slike prøver blir opparbeidet og analysert i bolker på 24 prøver, og selve opparbeidelsen tar cirka 2 timer. Normalt skjer dette på is, og

sentrifugeringen skjer ved 4 °C. I MR-spektrometerets prøvesampler er det også 4 °C. Ved optimale forhold er prøvene analysert i løpet av 4 timer, men noen prøver vil altså ha vært i 4 °C i opptil 6 timer før analysering. Denne ikke-kontrollerbare tidsfaktoren kan, om prøvene er oppbevart lenge etter tining, ha påvirket prøvedataene som ble undersøkt.

Ved analyse av urinprøver vil mengde urin påvirke konsentrasjonen av metabolitter i urin. For å korrigere for variasjoner forårsaket av urinens fortynningsgrad ble datamaterialet normalisert på to ulike måter; mot kreatinin og mot totalspektrum. Normalisering mot kreatinin blir ofte brukt innenfor klinisk kjemi og er vanlig ved for eksempel farmakologiske undersøkelser. Ved metabolomikkundersøkelser, da spesielt i forbindelse med forskning, blir det derimot normalisert mot totalspektra. (5) Normalisering mot kreatinin kan være noe sårbart, da det kun er én enkeltverdi man normaliserer mot. Normalisering mot totalspektra regnes som en mer robust metode (9), da man benytter alle konsentrasjonene. En avvikende måling vil ikke påvirke resultatet av normaliseringen mot totalspektra i like stor grad som en avvikende kreatininmåling ved normalisering mot kreatinin.

Rådatamaterialet som ble undersøkt hadde mange metabolitter med konsentrasjonsverdier merket med «mindre enn» («<»). Ofte er dette lave konsentrasjonsverdier, som muligens ikke ville hatt stor påvirkning på totalkonsentrasjonen. På grunn av det høye antallet konsentrasjoner merket med «<», ble det fryktet at det ville være for få konsentrasjoner igjen til å kunne gi et realistisk svar dersom disse ble utelatt. Ved normalisering mot totalspektra ble derfor alle verdiene i datamaterialet tatt med, inkludert konsentrasjonsverdier merket med «<». Ved undersøkelse av alle donorene ble det funnet at gjennomsnitt for andel av totalspektra som blir utgjort av konsentrasjonsverdier merket med «<» var på 76 %. Det ligger derfor en viss usikkerhet rundt estimatet av totalkonsentrasjonen.

Ved undersøkelse av citrat ble det med begge normaliseringsmetodene funnet en p-verdi på 0,01 for undergruppene «Kvinner og Menn – prøver oppbevart < 2 timer». Ved normalisering mot kreatinin ligger variasjonskoeffisientene for alle undergruppene mellom 24-86 %, mens de ved normalisering mot totalspektra ligger mellom 21-80 %. Generelt er det sånn at jo lavere variasjonskoeffisient en analysemetode gir, jo lettere er det å påvise sanne forskjeller. Med utgangspunkt i gruppen donorer som var tilgjengelig til oppgaven, kan overensstemmelsen mellom resultatene ved normalisering mot kreatinin og totalspektra tyde

på at kreatinin er et godt mål for urinkonsentrasjonen. Likevel er ikke dette noe som kan sies med sikkerhet, da den faktiske korrelasjonen mellom metodene ikke ble undersøkt.

Siden datamaterialet kom fra analyser av en svært heterogen gruppe donorer, uten alikvoter behandlet ulikt med tanke på oppbevaringstid og -forhold (temperatur), var det ikke mulig å utføre en holdbarhetsstudie etter normale prosedyrer. Derfor ble det etter normalisering av datamaterialet mot både kreatinin og totalspektrum, samt inndeling i grupper, valgt å undersøke rådata med beregning av gjennomsnitt, standardavvik og variasjonskoeffisient (%CV). Dette ble gjort både ved undersøkelse av lagringsinstabilitet og ved undersøkelse av hvorvidt det var signifikante konsentrasjonsforskjeller av de utvalgte metabolittene mellom grupper i datamaterialet.

Ved undersøkelse av konsentrasjonsforskjeller ble det brukt tosidig t-test for å sammenligne gruppene for alle metabolittene. Det samme ble brukt ved undersøkelse av lagringsinstabilitet for alle metabolittene mellom prøver oppbevart < 2 timer før frys og ≥ 2 timer før frys. F-test ble benyttet for å avgjøre hvor det skulle benyttes t-test for to utvalg med lik varians og hvor det skulle benyttes t-test for to utvalg med ulik varians. Kun p-verdier $< 0,05$ ble vurdert som statistisk signifikant forskjell mellom grupper.

Av litteratur og kilder til bacheloroppgaven ble det hovedsakelig benyttet pensum fra bioingeniørutdanningen ved NTNU og forskningsartikler fra databasen PubMed. PubMed regnes som den største offentlig tilgjengelige databasen med litteratur innen biomedisinsk vitenskap, og inneholder kun publisert litteratur. Pensum fra utdanningen og publiserte forskningsartikler anses som kvalitetssikrede og trygge kilder å benytte.

4.2 Drøfting av resultater

I denne bacheloroppgaven blir lagringsinstabilitet av metabolittene alanin, citrat, glysin, hippurate og trigonelline i urin undersøkt. Det blir også undersøkt hvorvidt det er signifikante forskjeller mellom grupper i datamaterialet.

Undersøkelse av om hvorvidt det er signifikante forskjeller mellom grupper

Det forventes å finne en høyere konsentrasjon av citrat i urin hos kvinner enn hos menn, og at urinprøver hos eldre har en høyere konsentrasjon av trigonelline enn det urinprøver hos yngre har. (8) Ved beregninger i denne oppgaven ble det for citrat funnet en p-verdi på 0,01 for gruppene «kvinner» og «menn» ved oppbevaring < 2 timer før frys med begge normaliseringsmåtene (kreatinin og totalspektra). «Kvinner» hadde en variasjonskoeffisient (%CV) ~ 43 %, og «menn» %CV på ~ 40 % (tilnærmet likt ved begge normaliseringsmåter). Ved oppbevaring lenger enn 2 timer før frys ble det derimot ikke funnet en signifikant forskjell mellom gruppene. For de andre metabolittene, inkludert trigonelline, ble det ikke funnet signifikante forskjeller mellom noen av undergruppene (kvinner og menn, og unge og eldre) uavhengig av oppbevaringstid før frys.

Variasjonskoeffisienten (%CV) er et spredningsmål på den relative variasjonen i et datasett. %CV ved normalisering mot kreatinin varierte fra 24 til 86 %, og fra 21 til 80 % ved normalisering mot totalspektra. Det betyr at det er store spredninger i konsentrasjonsverdier i gruppene, og at det dermed vil være vanskelig å kunne påvise sanne forskjeller mellom dem.

Konsentrasjonsverdiene i vårt datamateriale ble sammenlignet med verdier fra andre studier for å undersøke om det er realistiske konsentrasjonsverdier. I studien «Urinary Composition in Men and Women and the Risk of Urolithiasis» av Sarada et al. (24) undersøkes blant annet metabolitten citrat i urin, som også inkluderes i vår oppgave. Der ligger konsentrasjonsverdiene for citrat (normalisert mot kreatinin) i samme område som våre verdier. Konsentrasjonsverdiene (gjennomsnitt for grupper av kvinner, n = 20) i studiet er oppgitt med SE (standardfeil), men ved omregning betyr det at variasjonskoeffisienter (%CV) for gruppene ligger på 44-55 %. %CV i datamaterialet (citrat, kvinner) som blir undersøkt i denne oppgaven ligger på 42-43 %. Det kan tyde på funn av realistiske variasjoner for denne typen målinger. Resultatene vil ha en total feilmargin som inkluderer både analytisk variasjon og biologisk variasjon, og sistnevnte kan være meget høy for komponenter i urin. (25)

Funn av p-verdi på 0,01 mellom grupper («kvinner» og «menn» for citrat) kan tyde på at det er signifikant forskjell mellom dem, men det trenger ikke å bety at det faktisk stemmer. T-test benyttes her for å teste om det er signifikant forskjell mellom gjennomsnittsverdiene i to datasett. Utvalgene inneholder kun $n = 10$ verdier og har %CV på $\sim 40\%$, så det er mulig at p-verdien ville vært annerledes med et annet utvalg.

På grunn av de høye variasjonskoeffisientene er det viktig å være bevisst at funn av ikke-signifikante forskjeller heller ikke trenger å stemme. For eksempel for trigonelline, hvor det er kjent at det er forskjell i konsentrasjonsverdier mellom unge og eldre, ble det ikke funnet noen signifikant endring. Undersøkelsene kunne muligens gitt andre p-verdier ved bruk av andre donorer, og mulig lavere variasjonskoeffisienter. Med fremgangsmåten og datamaterialet brukt ved denne oppgaven, ser vi at konsentrasjonsverdiene og forskjellen mellom grupper på generell basis måtte ha vært doblet, av og til tredoblet, for at det skulle ha kunnet oppstått forskjeller store nok til å få p-verdier $< 0,05$. Motsatt ville metabolittene måtte ha blitt degenerert nesten totalt for å kunne få en signifikant endring ved negativ konsentrasjonsutvikling. Dette viser at dette datamaterialet måtte ha hatt en ganske betydelig endring i konsentrasjonsverdier, for at de skulle kunnet blitt registrert som signifikante.

Ved sammenligning av gjennomsnittsverdier for undergruppene ble det funnet en oppgang/nedgang i konsentrasjonsverdier for enkelte metabolitter fra lagring < 2 timer før frys til lagring ≥ 2 timer før frys. For eksempel for citrat («kvinner» og «menn» oppbevart < 2 timer) hvor konsentrasjonsverdien synker hos kvinner ved lang lagring før frys, mens det øker hos menn. Biologisk kan ikke slike endringer mellom undergrupper forklares, og det kan tyde på at funnene er delvis tilfeldige og veldig avhengig av hvilke verdier som har blitt inkludert i gruppene.

Undersøkelse av lagringsinstabilitet av metabolittene

Ved undersøkelse av lagringsinstabilitet av metabolittene alanin, citrat, glysin, hippurate og trigonelline ble tilgjengelige verdier for metabolittene (kreatinin-justerte) inndelt i grupper basert på tid før frys (< 2 timer og ≥ 2 timer).

Ved beregning ble det ikke funnet noen signifikant forskjell mellom gruppene basert på tid før frys (p-verdier fra 0,32 til 0,86). Variasjonskoeffisientene (%CV) varierte fra 35 til 118 %. På grunn av de høye variasjonskoeffisientene er det også her viktig å være bevisst at funn av ikke-signifikante forskjeller ikke trenger å stemme. Med fremgangsmetoden og datamaterialet brukt i denne oppgaven vil det være vanskelig å oppdage små signifikante forskjeller i konsentrasjoner pga. store variasjoner innad i gruppene. Derfor kan vi ved undersøkelse av datamaterialet si at eventuelle endringer i konsentrasjoner *ikke* overstiger 2-3 ganger konsentrasjonsverdi funnet ved oppbevaring < 2 timer, da disse endringene ville blitt oppdaget som signifikant forskjellige med t-test (p-verdi < 0,05). Det at det ikke ble funnet noen signifikante forskjeller mellom gruppene inndelt etter tid kan tyde på at metabolittene er stabile ved oppbevaring i urin, men det kan være vanskelig å konkludere med dette datamaterialet.

Ved gjennomføring av den faktiske holdbarhetsstudien slik den er skissert per dags dato er det planlagt å alikvotere urinprøvene i alikvoter som ville blitt oppbevart i opptil 24 timer i både romtemperatur (25 °C) og ved -4 °C før prøvene settes i fryser (-80 °C). Prøvene vil deretter analyseres samlet med MR-spektroskopi. I studien «Urine metabolome profiling of immune-mediated inflammatory diseases» av Alonso et al. (26) ble det undersøkt om metabolitter i urin kunne benyttes som biomarkører for inflammatoriske sykdommer. Studien ble utført i Spania, og det ble samlet inn urinprøver fra 1400 mennesker (n = 1200 syke, n = 200 kontroller) ved kliniske avdelinger tilhørende flere universitetssykehus i Spania. Prøvene ble deretter transportert til universitetssykehusene innen 24 timer, hvor de ble alikvotert og satt i -80 °C-fryser umiddelbart ved ankomst. Metabolittkonsentrasjonene som ble funnet ved analyse (MR-spektroskopi) ble normalisert mot totalspektra. Ved lokal innsamling og analysing av urinprøver med MR-spektroskopi er det derfor realistisk å anta at 24 timer vil være maksimal tid for oppbevaring før frys. Med tanke på en eventuell nasjonal innsamling av urinprøver til slike analyser, vil det ikke være urealistisk at prøver vil være oppbevart > 24 timer i romtemperatur før ankomst til laboratoriet. Det kan derfor være interessant, mener vi, å undersøke holdbarheten til metabolittene også etter oppbevaring i romtemperatur i 48 timer, kanskje også 72 timer, før frys.

4.3 Konklusjon

Ved undersøkelse av forskjeller mellom grupper i datamaterialet ble det funnet signifikant mer citrat i urinprøver fra kvinner sammenlignet med menn ved oppbevaring < 2 timer før frys (p -verdi = 0,01). Det ble ikke funnet signifikant forskjell for disse gruppene ved oppbevaring ≥ 2 timer før frys, og heller ikke mellom noen andre grupper for de andre metabolittene uavhengig av oppbevaringstid før frys. Ved undersøkelse av lagringsinstabilitet av metabolittene ble det ikke funnet noen signifikante forskjeller for gjennomsnittsverdier ved lagring < 2 timer før frys og ≥ 2 timer før frys.

På grunn av relativt store variasjoner i konsentrasjonsverdier i datasettet som ble undersøkt er det vanskelig å kunne finne sikre resultater. Det kan se ut som at resultatene i stor grad er avhengig av verdiene som ble inkludert i de ulike gruppene, og at variasjoner som blir funnet mellom prøver antagelig er større enn effekter av prøvebehandling. For å bedre kunne konkludere hvordan lagringsinstabiliteten for metabolittene er, bør det utføres en holdbarhetsstudie.

5. Referanser

1. Berg JP, Henninge J, Lund T. Påvisning av nye biomarkører i plasma-proteomet. *Nor Epidemiol* [Internett]. 9. oktober 2009 [sitert 12. mai 2020];16(1). Tilgjengelig på: <http://www.ntnu.no/ojs/index.php/norepid/article/view/203>
2. Wehrens R, Can IA for R on. *Metabolomics: Practical Guide to Design and Analysis*. CRC Press; 2019. 313 s.
3. MR-metabolomikk i jakten på biomarkører [Internett]. *Bioingeniøren*. [sitert 24. mars 2020]. Tilgjengelig på: <http://www.bioingeniøren.no/fag/fag-oversiktsartikkel/mr-metabolomikk-i-jakten-pa-biomarkorer/>
4. Wang F, Debik J, Andreassen T, Euceda LR, Haukaas TH, Cannet C, mfl. Effect of Repeated Freeze–Thaw Cycles on NMR-Measured Lipoproteins and Metabolites in Biofluids. *J Proteome Res*. 2019;8.
5. Brunzel NA. *Fundamentals of Urine & Body Fluid Analysis* [Internett]. Fourth Edition. Bd. 429. Elsevier; 2018. Tilgjengelig på: <http://evolve.elsevier.com>
6. Sitter B. Bachelor-oppgave_Bioingeniør_vår2020_holdbarhetsstudie urin[2]. 2020.
7. Slupsky CM, Rankin KN, Wagner J, Fu H, Chang D, Weljie AM, mfl. Investigations of the Effects of Gender, Diurnal Variation, and Age in Human Urinary Metabolomic Profiles. *Anal Chem*. 1. september 2007;79(18):6995–7004.
8. Rotter M, Brandmaier S, Prehn C, Adam J, Rabstein S, Gawrych K, mfl. Stability of targeted metabolite profiles of urine samples under different storage conditions. *Metabolomics* [Internett]. 2017 [sitert 12. mai 2020];13(1). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5126183/>
9. Alonso A, Julià A, Vinaixa M, Domènech E, Fernández-Nebro A, Cañete JD, mfl. Urine metabolome profiling of immune-mediated inflammatory diseases. *BMC Med* [Internett]. 8. september 2016 [sitert 24. mars 2020];14(1). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5016926/>
10. Metabolomics. I: Wikipedia [Internett]. 2020 [sitert 23. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Metabolomics&oldid=940578137>
11. Khamis MM, Adamko DJ, El-Aneed A. Mass spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery. *Mass Spectrom Rev*. 2017;36(2):115–34.
12. Maher AD, Zirah SFM, Holmes E, Nicholson JK. Experimental and analytical variation in human urine in 1H NMR spectroscopy-based metabolic phenotyping studies. *Anal Chem*. 15. juli 2007;79(14):5204–11.
13. Wang X, Zhang A, Han Y, Wang P, Sun H, Song G, mfl. Urine Metabolomics Analysis for Biomarker Discovery and Detection of Jaundice Syndrome in Patients With Liver Disease. *Mol Cell Proteomics MCP*. august 2012;11(8):370–80.
14. MR-metabolomikk i jakten på biomarkører | *Bioingeniøren* [Internett]. [sitert 24. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.bioingeniøren.no/fag/fag-oversiktsartikkel/mr-metabolomikk-i-jakten-pa-biomarkorer/>
15. Blüml S. *Magnetic Resonance Spectroscopy: Basics*. I: Blüml S, Panigrahy A, redaktører. *MR Spectroscopy of Pediatric Brain Disorders* [Internett]. New York, NY: Springer; 2013 [sitert 5. mai 2020]. s. 11–23. Tilgjengelig på: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5864-8_2
16. Jiménez B, Holmes E, Heude C, Tolson RF, Harvey N, Lodge SL, mfl. Quantitative Lipoprotein Subclass and Low Molecular Weight Metabolite Analysis in Human Serum and Plasma by ¹H NMR Spectroscopy in a Multilaboratory Trial. *Anal Chem*. 16. oktober 2018;90(20):11962–71.
17. Liu L, Mo H, Wei S, Raftery D. Quantitative analysis of urea in human urine and serum by 1H nuclear magnetic resonance. *The Analyst*. 7. februar 2012;137(3):595–600.

18. Husøy A-M. Blodprøvetaking i praksis. 2. utgave. Bd. 195. Cappelen Damm Akademisk; 2017.
19. Hepsø PH, Hegseth H. Blodprøvetaking - venøs blodprøvetaking av voksne og barn (ID: 1756) [Internett]. 2017. Tilgjengelig på: <http://eqsstolav/cgi-bin/document.pl?pid=stolav&DocumentID=1756&UnitID=155>
20. Westin AA. Cannabis og urinprøver. Tidsskr Den Nor Legeforening [Internett]. 18. mars 2011 [sitert 24. april 2020]; Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/2011/03/oversiktsartikkel/cannabis-og-urinprover>
21. Sitter B. Re: Tabell resultater (E-post 27.04.2020). 2020.
22. Barton RH, Nicholson JK, Elliott P, Holmes E. High-throughput 1H NMR-based metabolic analysis of human serum and urine for large-scale epidemiological studies: validation study. *Int J Epidemiol*. 1. april 2008;37(suppl_1):i31–40.
23. Tolking av prøveresultater [Internett]. St. Olavs hospital. [sitert 15. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://stolav.no/fag-og-forskning/lab/tolking-av-proveresultater>
24. Sarada B, Satyanarayana U. Urinary composition in men and women and the risk of urolithiasis. *Clin Biochem*. desember 1991;24(6):487–90.
25. Analyser og undersøkelser, Fagområdet medisinsk biokjemi, St. Olavs Hospital [Internett]. [sitert 18. mai 2020]. Tilgjengelig på: https://data.stolav.no/labhandboker/Medisinsk_biokjemi/ambbok.html
26. Alonso A, Julià A, Vinaixa M, Domènech E, Fernández A, Cañete JD, mfl. ADDITIONAL INFORMATION URINE METABOLOME PROFILING IN IMMUNE-MEDIATED INFLAMMATORY DISEASES. :19.
27. Åsberg A, Solem KB, Mikkelsen G. Prøvematerialets holdbarhet-kriterier og vurderinger. I: *Klinisk Biokemi i Norden* Nr 4, vol 23 [Internett]. 2011 [sitert 26. mars 2020]. Tilgjengelig på: http://kbn.nfkk.org/kbn_2011_4/kbn_2011_3/assets/basic-html/page34.html
28. Aakre KM, Rustad P, Eilertsen H, Kalfoss T, Åsberg A, Kristoffersen AH. Utføre holdbarhetsforsøk? [Internett]. Norsk Klinisk-kjemisk kvalitetssikring (NKK), Bioingeniørfaglig institutt (BFI), Norsk selskap for medisinsk biokjemi (NSMB).; 2015 [sitert 30. april 2020]. Tilgjengelig på: https://www.noklus.no/media/3wsftsfsz/22_holdbarhet-protokoll_hvordan-utf%C3%B8re-holdbarhetsfors%C3%B8k.pdf
29. Drogset S. Statistikk i bacheloroppgave HBIO3001 Litt repetisjon og påfyll..... 2020 mar 11.
30. Lea T. Immunologi og immunologiske teknikker. 3. utgave. Bd. 400. Fagbokforlaget; 2016.
31. Boehncke W-H, Schön MP. Psoriasis. *The Lancet*. 5. september 2015;386(9997):983–94.
32. Zachariae H. Prevalence of joint disease in patients with psoriasis: implications for therapy. *Am J Clin Dermatol*. 2003;4(7):441–7.
33. VanMeter KC, Hubert RJ. *Gould's Pathophysiology for the Health Professions*. 5. utgave. Bd. 236. Saunders; 2013.
34. Hva skjer i huden ved psoriasis? | Pfizer [Internett]. [sitert 29. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.pfizer.no/helse/psoriasis/hva-skjer-i-huden-ved-psoriasis>
35. Lebwohl M. Psoriasis. *Ann Intern Med*. 3. april 2018;168(7):ITC49.
36. Zachariae H, Zachariae R, Blomqvist K, Davidsson S, Molin L, Mørk C, mfl. Quality of life and prevalence of arthritis reported by 5,795 members of the Nordic Psoriasis Associations. Data from the Nordic Quality of Life Study. *Acta Derm Venereol*. 2002;82(2):108–13.
37. Gladman DD, Antoni C, Mease P, Clegg DO, Nash P. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Ann Rheum Dis*. 1. mars 2005;64(suppl 2):ii14–7.

38. Hva er psoriasisartritt? | PEF Norge [Internett]. [sitert 26. mars 2020]. Tilgjengelig på: <http://www.hudportalen.no/psoriasisartritt/hva-er-psoriasisartritt>

6. Vedlegg

Vedlegg 1: Rådata/datamateriale

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Creatinin	Alanine	Glycine	Hippuric acid	Trigonelline	Citric acid
202431	1	Psoriasis	Kvinne	48	04:30	15	0,35	< 0,5	< 2,5	0,69	4,2
203408	2	Psoriasis	Kvinne	79	03:02	5,4	0,21	0,63	1,9	0,51	1,8
203869	3	Psoriasis	Mann	27	04:15	18	0,39	0,74	3,1	< 0,63	1,4
215440	4	Psoriasis	Kvinne	32	01:55	23	0,55	< 0,77	4,8	< 0,78	5,8
216861	5	Psoriasis	Kvinne	57	02:29	15	0,18	0,86	< 2,6	< 0,53	4
217208	6	Psoriasis	Kvinne	53	01:45	6,7	0,19	0,67	< 1,1	0,7	1,8
217281	7	Kontroll	Kvinne	61	01:10	18	0,22	0,96	11	0,73	4,1
217282	8	Kontroll	Kvinne	48	00:33	5,5	0,07	0,44	2,4	0,2	2
217394	9	Psoriasis	Mann	46	01:00	26	0,42	1,1	< 4,4	< 0,9	5,1
217450	10	Psoriasis	Kvinne	30	01:25	3,7	0,13	0,92	0,81	< 0,13	1,2
217622	12	Kontroll	Mann	43	00:30	7,8	0,11	0,46	1,3	< 0,27	2,2
218982	13	Psoriasis	Mann	63	03:40	5,5	0,42	0,43	1,7	0,49	2,7
219466	14	Psoriasis	Kvinne	33	01:55	31	< 0,32	< 1,1	10	1,7	< 1,2
219682	15	Psoriasis	Kvinne	54	05:21	7,2	0,1	0,32	< 1,2	< 0,25	1,2
219774	16	Psoriasis	Kvinne	16	02:00	13	0,22	0,9	4,3	0,58	< 0,51
219982	17	Psoriasis	Mann	53	01:10	7	0,25	1,1	2,3	0,49	0,33
220379	19	Psoriasis	Kvinne	28	02:00	9,7	0,31	3,2	0,2	0,64	4
220642	20	Psoriasis	Kvinne	57	00:45	9,5	0,14	1,3	6,1	0,81	3,4
220643	21	Psoriasis	Kvinne	37	01:00	2,8	0,11	1,1	< 0,48	< 0,1	< 0,11
220850	22	Psoriasis	Mann	65	01:15	1,5	0,03	0,08	0,94	< 0,05	0,45
220949	23	Psoriasis	Kvinne	48	02:30	20	0,39	1,4	5,4	1,1	3,4
221207	24	Psoriasis	Kvinne	21	04:30	33	< 0,34	1,5	< 5,7	< 1,2	4,3
221220	25	Psoriasis	Kvinne	46	01:35	9,3	0,32	1,7	4,9	< 0,32	2,3
221301	26	Psoriasis	Kvinne	21	01:00	1,7	0,06	0,23	0,71	0,1	0,88
221307	28	Kontroll	Kvinne	35	01:10	5,7	0,14	0,96	1,1	< 0,2	3,3
221308	29	Kontroll	Kvinne	30	01:35	16	0,21	1,4	19	< 0,54	3
221370	30	Kontroll	Kvinne	43	02:10	13	< 0,13	0,95	3,7	< 0,43	4,9
221372	31	Kontroll	Kvinne	39	01:45	2,6	0,1	0,4	1,5	< 0,09	1,2
221424	32	Kontroll	Mann	37	05:40	22	0,47	1,4	< 3,8	0,88	3,3
221425	33	Kontroll	Kvinne	59	06:30	15	0,25	0,65	3,1	0,61	6,7
221507	34	Kontroll	Mann	48	04:30	17	0,33	0,96	5,7	0,83	2,1
221508	35	Kontroll	Mann	33	03:20	13	0,16	0,65	4,9	0,63	< 0,52
221562	37	Psoriasis	Mann	66	01:00	4,2	1,1	0,14	5,8	1,1	2,6
221601	38	Psoriasis artritt	Kvinne	32	02:00	4,7	0,12	0,73	< 0,8	< 0,16	1,2
222055	39	Psoriasis	Mann	58	03:30	7,1	< 0,07	0,4	2	< 0,25	2,2

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Creatinin	Alanine	Glycine	Hippuric acid	Trigonelline	Citric acid
222126	40	Kontroll	Kvinne	32	01:55	11	0,16	0,97	5,7	< 0,38	1,6
222177	41	Kontroll	Mann	33	01:15	9	< 0,09	< 0,31	2,2	< 0,31	1,8
222266	42	Psoriasis	Kvinne	79	02:30	8,9	0,51	6,6	7,3	0,64	3,6
222267	43	Psoriasis	Kvinne	66	03:00	11	0,17	0,94	7,1	< 0,4	2,3
222268	44	Psoriasis	Kvinne	69	00:45	22	0,63	1,3	12	< 0,77	4,5
222269	45	Psoriasis	Kvinne	71	05:00	4,9	0,09	0,32	3,9	0,36	1,9
222303	46	Psoriasis	Kvinne	64	01:45	9,6	< 0,1	0,63	4,2	0,84	2,1
222352	47	Psoriasis	Mann	71	05:00	15	0,18	1,8	7,8	1,7	2,3
222535	48	Psoriasis	Kvinne	40	03:30	11	0,15	0,96	< 1,9	< 0,39	1,6
233091	50	Psoriasis	Mann	57	07:30	6,1	0,15	0,49	2	0,45	0,74
233460	51	Psoriasis	Mann	42	01:10	28	< 0,29	< 0,95	12	2,3	4,5
233676	52	Psoriasis	Kvinne	50	02:25	3,8	0,12	0,64	1,3	0,25	< 0,15
233783	53	Psoriasis	Mann	49	01:00	17	0,3	0,88	< 3,0	< 0,60	4,1
233792	54	Psoriasis	Mann	38	01:58	2,5	0,15	0,3	< 0,43	< 0,09	1,1
244045	57	Psoriasis	Kvinne	40	07:05	6,5	0,07	0,24	2,9	0,39	1,1
254113	58	Psoriasis	Mann	35	02:30	16	0,61	1,6	< 2,7	< 0,55	5,4
254377	59	Kontroll	Kvinne	31	05:30	9,1	0,28	1,6	5,1	0,55	3,3
254460	61	Kontroll	Mann	53	01:55	18	0,3	1,7	< 3	0,73	3,3
254474	62	Kontroll	Kvinne	64	01:45	8,3	0,26	0,98	4	0,47	3
254677	64	Kontroll	Kvinne	31	01:10	16	0,28	0,85	< 2,7	< 0,55	2,2
254678	65	Kontroll	Kvinne	29	01:10	7,3	0,24	1,3	2,4	0,26	3,7
254679	66	Kontroll	Mann	26	01:40	22	0,34	< 0,73	11	1,5	2,4
254687	67	Kontroll	Mann	28	01:00	7,3	0,2	0,69	< 1,2	< 0,25	1,5
254738	68	Kontroll	Kvinne	27	20:15	8,8	0,13	< 0,30	< 1,5	0,49	2,5
254741	69	Kontroll	Mann	35	06:00	10	< 0,11	0,35	< 1,8	< 0,36	< 0,41
254864	70	Kontroll	Mann	57	04:00	4,1	0,15	0,71	4,8	1,1	1,4
255071	71	Psoriasis	Kvinne	18	03:12	15	0,34	0,99	< 2,5	< 0,51	3,5
255366	72	Kontroll	Mann	37	03:58	8,7	0,15	0,58	4,2	0,92	1,1

Vedlegg 2: Gruppering av metabolitter (kreatininjusterte) med standardavvik og middelverdier

V2.1 Alanin

Alanin
Unge vs. Eldre - prøver oppbevart kort (< 2 timer)

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Alanine/creatinin
221301	26	Psoriasis	Kvinne	21	01:00	0,035
254679	66	Kontroll	Mann	26	01:40	0,015
254687	67	Kontroll	Mann	28	01:00	0,027
254678	65	Kontroll	Kvinne	29	01:10	0,033
217450	10	Psoriasis	Kvinne	30	01:25	0,035
221308	29	Kontroll	Kvinne	30	01:35	0,013
254677	64	Kontroll	Kvinne	31	01:10	0,018
215440	4	Psoriasis	Kvinne	32	01:55	0,024
222126	40	Kontroll	Kvinne	32	01:55	0,015
221307	28	Kontroll	Kvinne	35	01:10	0,025
Gjennomsnitt						0,024
Standardavvik						0,0085

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Alanine/creatinin
217282	8	Kontroll	Kvinne	48	00:33	0,013
233783	53	Psoriasis	Mann	49	01:00	0,018
219982	17	Psoriasis	Mann	53	01:10	0,036
217208	6	Psoriasis	Kvinne	53	01:45	0,028
254460	61	Kontroll	Mann	53	01:55	0,017
220642	20	Psoriasis	Kvinne	57	00:45	0,015
217281	7	Kontroll	Kvinne	61	01:10	0,012
254474	62	Kontroll	Kvinne	64	01:45	0,031
220850	22	Psoriasis	Mann	65	01:15	0,020
222268	44	Psoriasis	Kvinne	69	00:45	0,029
Gjennomsnitt						0,022
Standardavvik						0,0084

F-test	
p:	0,97
T-test	
p:	0,59
i %:	59 %

Alanin**Unge vs. Eldre - prøver oppbevart lenge (≥ 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Alanine/creatinin
219774	16	Psoriasis	Kvinne	16	02:00	0,017
255071	71	Psoriasis	Kvinne	18	03:12	0,023
203869	3	Psoriasis	Mann	27	04:15	0,022
254738	68	Kontroll	Kvinne	27	20:15	0,015
220379	19	Psoriasis	Kvinne	28	02:00	0,032
254377	59	Kontroll	Kvinne	31	05:30	0,031
221601	38	Psoriasis artritt	Kvinne	32	02:00	0,026
221508	35	Kontroll	Mann	33	03:20	0,012
254113	58	Psoriasis	Mann	35	02:30	0,038
255366	72	Kontroll	Mann	37	03:58	0,017
Gjennomsnitt						0,023
Standardavvik						0,0084

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Alanine/creatinin
216861	5	Psoriasis	Kvinne	57	02:29	0,012
254864	70	Kontroll	Mann	57	04:00	0,037
233091	50	Psoriasis	Mann	57	07:30	0,025
221425	33	Kontroll	Kvinne	59	06:30	0,017
218982	13	Psoriasis	Mann	63	03:40	0,076
222267	43	Psoriasis	Kvinne	66	03:00	0,015
222269	45	Psoriasis	Kvinne	71	05:00	0,018
222352	47	Psoriasis	Mann	71	05:00	0,012
222266	42	Psoriasis	Kvinne	79	02:30	0,057
203408	2	Psoriasis	Kvinne	79	03:02	0,039
Gjennomsnitt						0,031
Standardavvik						0,022

F-test

p: 0,010

T-test

p: 0,33

i %: 33 %

Alanin**Kvinner vs. Menn - prøver oppbevart kort (< 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Alanine/creatinin
217622	12	Kontroll	Mann	43	00:30	0,014
217394	9	Psoriasis	Mann	46	01:00	0,016
233783	53	Psoriasis	Mann	49	01:00	0,018
254687	67	Kontroll	Mann	28	01:00	0,027
219982	17	Psoriasis	Mann	53	01:10	0,036
220850	22	Psoriasis	Mann	65	01:15	0,020
254679	66	Kontroll	Mann	26	01:40	0,015
254460	61	Kontroll	Mann	53	01:55	0,017
233792	54	Psoriasis	Mann	38	01:58	0,060
Gjennomsnitt						0,025
Standardavvik						0,015

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Alanine/creatinin
217282	8	Kontroll	Kvinne	48	00:33	0,013
220642	20	Psoriasis	Kvinne	57	00:45	0,015
222268	44	Psoriasis	Kvinne	69	00:45	0,029
220643	21	Psoriasis	Kvinne	37	01:00	0,039
221301	26	Psoriasis	Kvinne	21	01:00	0,035
217281	7	Kontroll	Kvinne	61	01:10	0,012
221307	28	Kontroll	Kvinne	35	01:10	0,025
254677	64	Kontroll	Kvinne	31	01:10	0,018
254678	65	Kontroll	Kvinne	29	01:10	0,033
217450	10	Psoriasis	Kvinne	30	01:25	0,035
Gjennomsnitt						0,025
Standardavvik						0,010

F-test	
p:	0,28
T-test	
p:	0,92
i %:	92 %

Alanin**Kvinner vs. Menn - prøver oppbevart lenge (≥ 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Alanine/creatinin
254113	58	Psoriasis	Mann	35	02:30	0,038
221508	35	Kontroll	Mann	33	03:20	0,012
218982	13	Psoriasis	Mann	63	03:40	0,076
255366	72	Kontroll	Mann	37	03:58	0,017
254864	70	Kontroll	Mann	57	04:00	0,037
203869	3	Psoriasis	Mann	27	04:15	0,022
221507	34	Kontroll	Mann	48	04:30	0,019
222352	47	Psoriasis	Mann	71	05:00	0,012
221424	32	Kontroll	Mann	37	05:40	0,021
233091	50	Psoriasis	Mann	57	07:30	0,025
Gjennomsnitt						0,028
Standardavvik						0,019

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Alanine/creatinin
203408	2	Psoriasis	Kvinne	79	03:02	0,039
255071	71	Psoriasis	Kvinne	18	03:12	0,023
222535	48	Psoriasis	Kvinne	40	03:30	0,014
202431	1	Psoriasis	Kvinne	48	04:30	0,023
222269	45	Psoriasis	Kvinne	71	05:00	0,018
219682	15	Psoriasis	Kvinne	54	05:21	0,014
254377	59	Kontroll	Kvinne	31	05:30	0,031
221425	33	Kontroll	Kvinne	59	06:30	0,017
244045	57	Psoriasis	Kvinne	40	07:05	0,011
254738	68	Kontroll	Kvinne	27	20:15	0,015
Gjennomsnitt						0,021
Standardavvik						0,0087

F-test	
p:	0,029
T-test	
p:	0,29
i %:	29 %

V2.2 Citrat

Citrat Unge vs. Eldre - prøver oppbevart kort (< 2 timer)

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Citric acid/Creatinin
221301	26	Psoriasis	Kvinne	21	01:00	0,52
254679	66	Kontroll	Mann	26	01:40	0,11
254687	67	Kontroll	Mann	28	01:00	0,21
254678	65	Kontroll	Kvinne	29	01:10	0,51
217450	10	Psoriasis	Kvinne	30	01:25	0,32
221308	29	Kontroll	Kvinne	30	01:35	0,19
254677	64	Kontroll	Kvinne	31	01:10	0,14
215440	4	Psoriasis	Kvinne	32	01:55	0,25
222126	40	Kontroll	Kvinne	32	01:55	0,15
222177	41	Kontroll	Mann	33	01:15	0,20
Gjennomsnitt						0,26
Standardavvik						0,15

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Citric acid/Creatinin
233783	53	Psoriasis	Mann	49	01:00	0,24
219982	17	Psoriasis	Mann	53	01:10	0,047
217208	6	Psoriasis	Kvinne	53	01:45	0,27
254460	61	Kontroll	Mann	53	01:55	0,18
220642	20	Psoriasis	Kvinne	57	00:45	0,36
217281	7	Kontroll	Kvinne	61	01:10	0,23
222303	46	Psoriasis	Kvinne	64	01:45	0,22
254474	62	Kontroll	Kvinne	64	01:45	0,36
220850	22	Psoriasis	Mann	65	01:15	0,30
222268	44	Psoriasis	Kvinne	69	00:45	0,21
Gjennomsnitt						0,24
Standardavvik						0,091

F-test	
p:	0,17
T-test	
p:	0,75
i %:	75 %

Citrat**Unge vs. Eldre - prøver oppbevart lenge (≥ 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Citric acid/Creatinin
255071	71	Psoriasis	Kvinne	18	03:12	0,23
221207	24	Psoriasis	Kvinne	21	04:30	0,13
203869	3	Psoriasis	Mann	27	04:15	0,078
254738	68	Kontroll	Kvinne	27	20:15	0,28
220379	19	Psoriasis	Kvinne	28	02:00	0,41
254377	59	Kontroll	Kvinne	31	05:30	0,36
221601	38	Psoriasis artritt	Kvinne	32	02:00	0,26
254113	58	Psoriasis	Mann	35	02:30	0,34
255366	72	Kontroll	Mann	37	03:58	0,13
221424	32	Kontroll	Mann	37	05:40	0,15
Gjennomsnitt						0,24
Standardavvik						0,11

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Citric acid/Creatinin
254864	70	Kontroll	Mann	57	04:00	0,34
233091	50	Psoriasis	Mann	57	07:30	0,12
222055	39	Psoriasis	Mann	58	03:30	0,31
221425	33	Kontroll	Kvinne	59	06:30	0,45
218982	13	Psoriasis	Mann	63	03:40	0,49
222267	43	Psoriasis	Kvinne	66	03:00	0,21
222269	45	Psoriasis	Kvinne	71	05:00	0,39
222352	47	Psoriasis	Mann	71	05:00	0,15
222266	42	Psoriasis	Kvinne	79	02:30	0,40
203408	2	Psoriasis	Kvinne	79	03:02	0,33
Gjennomsnitt						0,32
Standardavvik						0,12

F-test	
p:	0,80
T-test	
p:	0,14
i %:	14 %

Citrat**Kvinner vs. Menn - prøver oppbevart kort (< 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Citric acid/Creatinin
217622	12	Kontroll	Mann	43	00:30	0,28
217394	9	Psoriasis	Mann	46	01:00	0,20
233783	53	Psoriasis	Mann	49	01:00	0,24
254687	67	Kontroll	Mann	28	01:00	0,21
219982	17	Psoriasis	Mann	53	01:10	0,047
233460	51	Psoriasis	Mann	42	01:10	0,16
220850	22	Psoriasis	Mann	65	01:15	0,30
222177	41	Kontroll	Mann	33	01:15	0,20
254679	66	Kontroll	Mann	26	01:40	0,11
254460	61	Kontroll	Mann	53	01:55	0,18
Gjennomsnitt						0,19
Standardavvik						0,076

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Citric acid/Creatinin
217282	8	Kontroll	Kvinne	48	00:33	0,36
220642	20	Psoriasis	Kvinne	57	00:45	0,36
222268	44	Psoriasis	Kvinne	69	00:45	0,21
221301	26	Psoriasis	Kvinne	21	01:00	0,52
217281	7	Kontroll	Kvinne	61	01:10	0,23
221307	28	Kontroll	Kvinne	35	01:10	0,58
254677	64	Kontroll	Kvinne	31	01:10	0,14
254678	65	Kontroll	Kvinne	29	01:10	0,51
217450	10	Psoriasis	Kvinne	30	01:25	0,32
221220	25	Psoriasis	Kvinne	46	01:35	0,25
Gjennomsnitt						0,35
Standardavvik						0,15

F-test	
p:	0,057
T-test	
p:	0,0089
i %:	1 %

Citrat**Kvinner vs. Menn - prøver oppbevart lenge (≥ 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Citric acid/Creatinin
254113	58	Psoriasis	Mann	35	02:30	0,34
222055	39	Psoriasis	Mann	58	03:30	0,31
218982	13	Psoriasis	Mann	63	03:40	0,49
255366	72	Kontroll	Mann	37	03:58	0,13
254864	70	Kontroll	Mann	57	04:00	0,34
203869	3	Psoriasis	Mann	27	04:15	0,078
221507	34	Kontroll	Mann	48	04:30	0,12
222352	47	Psoriasis	Mann	71	05:00	0,15
221424	32	Kontroll	Mann	37	05:40	0,15
233091	50	Psoriasis	Mann	57	07:30	0,12
Gjennomsnitt						0,22
Standardavvik						0,14

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Citric acid/Creatinin
255071	71	Psoriasis	Kvinne	18	03:12	0,23
222535	48	Psoriasis	Kvinne	40	03:30	0,15
202431	1	Psoriasis	Kvinne	48	04:30	0,28
221207	24	Psoriasis	Kvinne	21	04:30	0,13
222269	45	Psoriasis	Kvinne	71	05:00	0,39
219682	15	Psoriasis	Kvinne	54	05:21	0,17
254377	59	Kontroll	Kvinne	31	05:30	0,36
221425	33	Kontroll	Kvinne	59	06:30	0,45
244045	57	Psoriasis	Kvinne	40	07:05	0,17
254738	68	Kontroll	Kvinne	27	20:15	0,28
Gjennomsnitt						0,26
Standardavvik						0,11

F-test	
p:	0,55
T-test	
p:	0,51
i %:	51 %

V2.3 Glysin

Glysin

Unge vs. Eldre - prøver oppbevart kort (< 2 timer)

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Glysin/kreatinin
221301	26	Psoriasis	Kvinne	21	01:00	0,14
254687	67	Kontroll	Mann	28	01:00	0,095
254678	65	Kontroll	Kvinne	29	01:10	0,18
217450	10	Psoriasis	Kvinne	30	01:25	0,25
221308	29	Kontroll	Kvinne	30	01:35	0,088
254677	64	Kontroll	Kvinne	31	01:10	0,053
222126	40	Kontroll	Kvinne	32	01:55	0,088
221307	28	Kontroll	Kvinne	35	01:10	0,17
220643	21	Psoriasis	Kvinne	37	01:00	0,39
233792	54	Psoriasis	Mann	38	01:58	0,12
Gjennomsnitt						0,16
Standardavvik						0,10

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Glysin/kreatinin
233783	53	Psoriasis	Mann	49	01:00	0,052
219982	17	Psoriasis	Mann	53	01:10	0,16
217208	6	Psoriasis	Kvinne	53	01:45	0,10
254460	61	Kontroll	Mann	53	01:55	0,094
220642	20	Psoriasis	Kvinne	57	00:45	0,14
217281	7	Kontroll	Kvinne	61	01:10	0,053
222303	46	Psoriasis	Kvinne	64	01:45	0,066
254474	62	Kontroll	Kvinne	64	01:45	0,12
220850	22	Psoriasis	Mann	65	01:15	0,053
222268	44	Psoriasis	Kvinne	69	00:45	0,059
Gjennomsnitt						0,089
Standardavvik						0,038

F-test	
p:	0,0086
T-test	
p:	0,071
i %:	7 %

Glysin**Unge vs. Eldre - prøver oppbevart lenge (≥ 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Glysin/kreatinin
219774	16	Psoriasis	Kvinne	16	02:00	0,069
255071	71	Psoriasis	Kvinne	18	03:12	0,066
221207	24	Psoriasis	Kvinne	21	04:30	0,045
203869	3	Psoriasis	Mann	27	04:15	0,041
220379	19	Psoriasis	Kvinne	28	02:00	0,33
254377	59	Kontroll	Kvinne	31	05:30	0,18
221601	38	Psoriasis artritt	Kvinne	32	02:00	0,16
221508	35	Kontroll	Mann	33	03:20	0,050
254113	58	Psoriasis	Mann	35	02:30	0,10
254741	69	Kontroll	Mann	35	06:00	0,035
Gjennomsnitt						0,11
Standardavvik						0,092

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Glysin/kreatinin
254864	70	Kontroll	Mann	57	04:00	0,17
233091	50	Psoriasis	Mann	57	07:30	0,080
222055	39	Psoriasis	Mann	58	03:30	0,056
221425	33	Kontroll	Kvinne	59	06:30	0,043
218982	13	Psoriasis	Mann	63	03:40	0,078
222267	43	Psoriasis	Kvinne	66	03:00	0,085
222269	45	Psoriasis	Kvinne	71	05:00	0,065
222352	47	Psoriasis	Mann	71	05:00	0,12
203408	2	Psoriasis	Kvinne	79	03:02	0,12
Gjennomsnitt						0,091
Standardavvik						0,040

F-test	
p:	0,027
T-test	
p:	0,63
i %:	63 %

Glysin**Kvinner vs. Menn - prøver oppbevart kort (< 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Glysin/kreatinin
217622	12	Kontroll	Mann	43	00:30	0,059
217394	9	Psoriasis	Mann	46	01:00	0,042
233783	53	Psoriasis	Mann	49	01:00	0,052
254687	67	Kontroll	Mann	28	01:00	0,095
219982	17	Psoriasis	Mann	53	01:10	0,16
220850	22	Psoriasis	Mann	65	01:15	0,053
254460	61	Kontroll	Mann	53	01:55	0,094
233792	54	Psoriasis	Mann	38	01:58	0,12
Gjennomsnitt						0,084
Standardavvik						0,040

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Glysin/kreatinin
217282	8	Kontroll	Kvinne	48	00:33	0,080
220642	20	Psoriasis	Kvinne	57	00:45	0,14
222268	44	Psoriasis	Kvinne	69	00:45	0,059
220643	21	Psoriasis	Kvinne	37	01:00	0,39
221301	26	Psoriasis	Kvinne	21	01:00	0,14
217281	7	Kontroll	Kvinne	61	01:10	0,053
221307	28	Kontroll	Kvinne	35	01:10	0,17
254677	64	Kontroll	Kvinne	31	01:10	0,053
254678	65	Kontroll	Kvinne	29	01:10	0,18
217450	10	Psoriasis	Kvinne	30	01:25	0,25
Gjennomsnitt						0,15
Standardavvik						0,11

F-test	
p:	0,017
T-test	
p:	0,094
i %:	9 %

Glysin**Kvinner vs. Menn - prøver oppbevart lenge (≥ 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Glysin/kreatinin
222055	39	Psoriasis	Mann	58	03:30	0,056
218982	13	Psoriasis	Mann	63	03:40	0,078
255366	72	Kontroll	Mann	37	03:58	0,067
254864	70	Kontroll	Mann	57	04:00	0,17
203869	3	Psoriasis	Mann	27	04:15	0,041
221507	34	Kontroll	Mann	48	04:30	0,056
222352	47	Psoriasis	Mann	71	05:00	0,12
221424	32	Kontroll	Mann	37	05:40	0,064
254741	69	Kontroll	Mann	35	06:00	0,035
233091	50	Psoriasis	Mann	57	07:30	0,080
Gjennomsnitt						0,077
Standardavvik						0,041

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Glysin/kreatinin
222267	43	Psoriasis	Kvinne	66	03:00	0,085
203408	2	Psoriasis	Kvinne	79	03:02	0,12
255071	71	Psoriasis	Kvinne	18	03:12	0,066
222535	48	Psoriasis	Kvinne	40	03:30	0,087
221207	24	Psoriasis	Kvinne	21	04:30	0,045
222269	45	Psoriasis	Kvinne	71	05:00	0,065
219682	15	Psoriasis	Kvinne	54	05:21	0,044
254377	59	Kontroll	Kvinne	31	05:30	0,18
221425	33	Kontroll	Kvinne	59	06:30	0,043
244045	57	Psoriasis	Kvinne	40	07:05	0,037
Gjennomsnitt						0,077
Standardavvik						0,043

F-test

p: 0,74

T-test

p: 0,98

i %: 98 %

V2.4 Hippurate

Hippurat Unge vs. Eldre - prøver oppbevart kort (< 2 timer)

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Hippuric acid/Creatinin
221301	26	Psoriasis	Kvinne	21	01:00	0,42
254679	66	Kontroll	Mann	26	01:40	0,50
254678	65	Kontroll	Kvinne	29	01:10	0,33
217450	10	Psoriasis	Kvinne	30	01:25	0,22
221308	29	Kontroll	Kvinne	30	01:35	1,19
215440	4	Psoriasis	Kvinne	32	01:55	0,21
222126	40	Kontroll	Kvinne	32	01:55	0,52
222177	41	Kontroll	Mann	33	01:15	0,24
219466	14	Psoriasis	Kvinne	33	01:55	0,32
221307	28	Kontroll	Kvinne	35	01:10	0,19
Gjennomsnitt						0,41
Standardavvik						0,30

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Hippuric acid/Creatinin
217622	12	Kontroll	Mann	43	00:30	0,17
221220	25	Psoriasis	Kvinne	46	01:35	0,53
217282	8	Kontroll	Kvinne	48	00:33	0,44
219982	17	Psoriasis	Mann	53	01:10	0,33
220642	20	Psoriasis	Kvinne	57	00:45	0,64
217281	7	Kontroll	Kvinne	61	01:10	0,61
222303	46	Psoriasis	Kvinne	64	01:45	0,44
254474	62	Kontroll	Kvinne	64	01:45	0,48
220850	22	Psoriasis	Mann	65	01:15	0,63
222268	44	Psoriasis	Kvinne	69	00:45	0,55
Gjennomsnitt						0,48
Standardavvik						0,15

F-test	
p:	0,050
T-test	
p:	0,53
i %:	53 %

Hippurat**Unge vs. Eldre - prøver oppbevart lenge (≥ 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Hippuric acid/Creatinin
219774	16	Psoriasis	Kvinne	16	02:00	0,33
203869	3	Psoriasis	Mann	27	04:15	0,17
220379	19	Psoriasis	Kvinne	28	02:00	0,021
254377	59	Kontroll	Kvinne	31	05:30	0,56
221508	35	Kontroll	Mann	33	03:20	0,38
255366	72	Kontroll	Mann	37	03:58	0,48
244045	57	Psoriasis	Kvinne	40	07:05	0,45
Gjennomsnitt						0,34
Standardavvik						0,19

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Hippuric acid/Creatinin
254864	70	Kontroll	Mann	57	04:00	1,17
233091	50	Psoriasis	Mann	57	07:30	0,33
222055	39	Psoriasis	Mann	58	03:30	0,28
221425	33	Kontroll	Kvinne	59	06:30	0,21
218982	13	Psoriasis	Mann	63	03:40	0,31
222267	43	Psoriasis	Kvinne	66	03:00	0,65
222269	45	Psoriasis	Kvinne	71	05:00	0,80
222352	47	Psoriasis	Mann	71	05:00	0,52
222266	42	Psoriasis	Kvinne	79	02:30	0,82
203408	2	Psoriasis	Kvinne	79	03:02	0,35
Gjennomsnitt						0,54
Standardavvik						0,31

F-test	
p:	0,24
T-test	
p:	0,15
i %:	15 %

Hippurat**Kvinner vs. Menn - prøver oppbevart kort (< 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Hippuric acid/Creatinin
217622	12	Kontroll	Mann	43	00:30	0,17
219982	17	Psoriasis	Mann	53	01:10	0,33
233460	51	Psoriasis	Mann	42	01:10	0,43
220850	22	Psoriasis	Mann	65	01:15	0,63
222177	41	Kontroll	Mann	33	01:15	0,24
254679	66	Kontroll	Mann	26	01:40	0,50
Gjennomsnitt						0,38
Standardavvik						0,17

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Hippuric acid/Creatinin
217282	8	Kontroll	Kvinne	48	00:33	0,44
220642	20	Psoriasis	Kvinne	57	00:45	0,64
222268	44	Psoriasis	Kvinne	69	00:45	0,55
221301	26	Psoriasis	Kvinne	21	01:00	0,42
217281	7	Kontroll	Kvinne	61	01:10	0,61
221307	28	Kontroll	Kvinne	35	01:10	0,19
254678	65	Kontroll	Kvinne	29	01:10	0,33
217450	10	Psoriasis	Kvinne	30	01:25	0,22
221220	25	Psoriasis	Kvinne	46	01:35	0,53
221308	29	Kontroll	Kvinne	30	01:35	1,19
Gjennomsnitt						0,51
Standardavvik						0,28

F-test	
p:	0,27
T-test	
p:	0,33
i %:	33 %

Hippurat**Kvinner vs. Menn - prøver oppbevart lenge (≥ 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Hippuric acid/Creatinin
221508	35	Kontroll	Mann	33	03:20	0,38
222055	39	Psoriasis	Mann	58	03:30	0,28
218982	13	Psoriasis	Mann	63	03:40	0,31
255366	72	Kontroll	Mann	37	03:58	0,48
254864	70	Kontroll	Mann	57	04:00	1,17
203869	3	Psoriasis	Mann	27	04:15	0,17
221507	34	Kontroll	Mann	48	04:30	0,34
222352	47	Psoriasis	Mann	71	05:00	0,52
233091	50	Psoriasis	Mann	57	07:30	0,33
Gjennomsnitt						0,44
Standardavvik						0,29

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Hippuric acid/Creatinin
221370	30	Kontroll	Kvinne	43	02:10	0,29
233676	52	Psoriasis	Kvinne	50	02:25	0,34
220949	23	Psoriasis	Kvinne	48	02:30	0,27
222266	42	Psoriasis	Kvinne	79	02:30	0,82
222267	43	Psoriasis	Kvinne	66	03:00	0,65
203408	2	Psoriasis	Kvinne	79	03:02	0,35
222269	45	Psoriasis	Kvinne	71	05:00	0,80
254377	59	Kontroll	Kvinne	31	05:30	0,56
221425	33	Kontroll	Kvinne	59	06:30	0,21
244045	57	Psoriasis	Kvinne	40	07:05	0,45
Gjennomsnitt						0,47
Standardavvik						0,22

F-test	
p:	0,43
T-test	
p:	0,80
i %:	80 %

V2.5 Trigonelline

Trigonelline Unge vs. Eldre - prøver oppbevart kort (< 2 timer)

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Trigonelline/Creatinin
221301	26	Psoriasis	Kvinne	21	01:00	0,059
254679	66	Kontroll	Mann	26	01:40	0,068
254678	65	Kontroll	Kvinne	29	01:10	0,036
219466	14	Psoriasis	Kvinne	33	01:55	0,055
Gjennomsnitt						0,054
Standardavvik						0,014

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Trigonelline/Creatinin
233460	51	Psoriasis	Mann	42	01:10	0,082
217282	8	Kontroll	Kvinne	48	00:33	0,036
219982	17	Psoriasis	Mann	53	01:10	0,070
217208	6	Psoriasis	Kvinne	53	01:45	0,10
254460	61	Kontroll	Mann	53	01:55	0,041
220642	20	Psoriasis	Kvinne	57	00:45	0,085
217281	7	Kontroll	Kvinne	61	01:10	0,041
222303	46	Psoriasis	Kvinne	64	01:45	0,088
254474	62	Kontroll	Kvinne	64	01:45	0,057
Gjennomsnitt						0,067
Standardavvik						0,025

F-test	
p:	0,36
T-test	
p:	0,36
i %:	36 %

Trigonelline**Unge vs. Eldre - prøver oppbevart lenge (≥ 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Trigonelline/Creatinin
219774	16	Psoriasis	Kvinne	16	02:00	0,045
254738	68	Kontroll	Kvinne	27	20:15	0,056
220379	19	Psoriasis	Kvinne	28	02:00	0,066
254377	59	Kontroll	Kvinne	31	05:30	0,060
221508	35	Kontroll	Mann	33	03:20	0,048
255366	72	Kontroll	Mann	37	03:58	0,11
221424	32	Kontroll	Mann	37	05:40	0,040
244045	57	Psoriasis	Kvinne	40	07:05	0,060
Gjennomsnitt						0,060
Standardavvik						0,020

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Trigonelline/Creatinin
221507	34	Kontroll	Mann	48	04:30	0,049
233676	52	Psoriasis	Kvinne	50	02:25	0,066
254864	70	Kontroll	Mann	57	04:00	0,27
233091	50	Psoriasis	Mann	57	07:30	0,074
221425	33	Kontroll	Kvinne	59	06:30	0,041
218982	13	Psoriasis	Mann	63	03:40	0,089
222269	45	Psoriasis	Kvinne	71	05:00	0,073
222352	47	Psoriasis	Mann	71	05:00	0,11
222266	42	Psoriasis	Kvinne	79	02:30	0,072
203408	2	Psoriasis	Kvinne	79	03:02	0,094
Gjennomsnitt						0,094
Standardavvik						0,065

F-test	
p:	0,0060
T-test	
p:	0,15
i %:	15 %

Trigonelline**Kvinner vs. Menn - prøver oppbevart kort (< 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Trigonelline/Creatinin
219982	17	Psoriasis	Mann	53	01:10	0,070
233460	51	Psoriasis	Mann	42	01:10	0,082
254679	66	Kontroll	Mann	26	01:40	0,068
254460	61	Kontroll	Mann	53	01:55	0,041
Gjennomsnitt						0,065
Standardavvik						0,018

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Trigonelline/Creatinin
217282	8	Kontroll	Kvinne	48	00:33	0,036
220642	20	Psoriasis	Kvinne	57	00:45	0,085
221301	26	Psoriasis	Kvinne	21	01:00	0,059
217281	7	Kontroll	Kvinne	61	01:10	0,041
254678	65	Kontroll	Kvinne	29	01:10	0,036
217208	6	Psoriasis	Kvinne	53	01:45	0,10
222303	46	Psoriasis	Kvinne	64	01:45	0,088
254474	62	Kontroll	Kvinne	64	01:45	0,057
219466	14	Psoriasis	Kvinne	33	01:55	0,055
Gjennomsnitt						0,062
Standardavvik						0,025

F-test	
p:	0,62
T-test	
p:	0,83
i %:	83 %

Trigonelline**Kvinner vs. Menn - prøver oppbevart lenge (≥ 2 timer)**

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Trigonelline/Creatinin
221508	35	Kontroll	Mann	33	03:20	0,048
218982	13	Psoriasis	Mann	63	03:40	0,089
255366	72	Kontroll	Mann	37	03:58	0,11
254864	70	Kontroll	Mann	57	04:00	0,27
221507	34	Kontroll	Mann	48	04:30	0,049
222352	47	Psoriasis	Mann	71	05:00	0,11
221424	32	Kontroll	Mann	37	05:40	0,040
233091	50	Psoriasis	Mann	57	07:30	0,074
Gjennomsnitt						0,098
Standardavvik						0,074

Prosjekt-ID	Donor	Diagnose	Kjønn	Alder heltall	Tid til frys	Trigonelline/Creatinin
233676	52	Psoriasis	Kvinne	50	02:25	0,066
220949	23	Psoriasis	Kvinne	48	02:30	0,055
222266	42	Psoriasis	Kvinne	79	02:30	0,072
203408	2	Psoriasis	Kvinne	79	03:02	0,094
202431	1	Psoriasis	Kvinne	48	04:30	0,046
222269	45	Psoriasis	Kvinne	71	05:00	0,073
254377	59	Kontroll	Kvinne	31	05:30	0,060
221425	33	Kontroll	Kvinne	59	06:30	0,041
244045	57	Psoriasis	Kvinne	40	07:05	0,060
254738	68	Kontroll	Kvinne	27	20:15	0,056
Gjennomsnitt						0,062
Standardavvik						0,015

F-test	
p:	8,8E-05
T-test	
p:	0,21
i %:	21 %

Vedlegg 3: Informasjon om holdbarhetsstudier

For å vite hvordan oppbevaring kan påvirke analytter må man utføre holdbarhetsstudier. For å at prøvesvaret skal bli så korrekt som mulig er man avhengig av at konsentrasjonen av analytten ikke har endret seg vesentlig siden prøvetaking, i tillegg til at analysemetoden må måle riktig konsentrasjon. Ofte kan man slå opp i litteraturen for å finne informasjon om en analytts holdbarhet, men enkelte ganger ønsker man å utføre egne holdbarhetsstudier. Enten fordi informasjonen ikke er beskrevet tidligere, eller fordi laboratoriet ønsker å verifisere holdbarhetsdata. (27)

Kriterier for holdbarhet

Det har vært uenighet om kriterier for holdbarhet, mens forhold rundt prøven, hvordan måle tid, temperatur o.l. har det vært enighet om. Materialets evne til å opprettholde en erklært egenskap er innenfor definerte grener ved lagring under definerte forhold i et definert tidsrom blir definert i ISO Guide 30. Slik kan man også beskrive et prøvemateriale. (27)

Tillatt bias vil være det største avviket gjennomsnittsverdien av analytten kan ha for at analysen kan regnes som brukbar, og dermed vil største tillatte avvik være gjennomsnittsverdien \pm tillatt bias. Fraser har lansert ulike begreper for bias; «optimum performance», «desireable performance» og «minimum performance» som benytter henholdsvis 0,125, 0,250 og 0,375 ganger total normal biologisk variasjon. Om det finnes informasjon om normal biologisk variasjon for en endogen forbindelse vil det som oftest være greit å benytte «desireable performance». (27)

Det etableres et 90 %-konfidensintervall (KI) for gjennomsnittsverdien for å kunne ha en 95 % sannsynlighet for å oppdage at gjennomsnittsavviket er større enn tillatt bias. Konfidensintervallet må i sin helhet ligge innenfor grensene for tillatt bias for at man kan akseptere at prøvematerialet er holdbart. Ligger 90 %-KI utenfor grensene for tillatt bias kan man med 95 % sannsynlighet si at prøvematerialet ikke er holdbart, og om 90 %-KI inkluderer en akseptgrense vil det være tvil om holdbarheten. (27)

For den enkelte prøve må den ikke ha en verdi utenfor utgangsverdi \pm tillatt totalfeil. Den må havne innenfor denne grensen for å kunne anta at den fortsatt har sin kliniske nytteverdi. Tillatt totalfeil settes som $1,65 * \text{tillatt upresisjon} + \text{tillatt bias}$. (27)

Oppsummert om holdbarhet: Ved undersøkelse av holdbarhet undersøker man for endring i et visst antall prøver, samt at man ser etter endring i den enkelte prøve. Da får man to kriterier for holdbarhet;

1. Gjennomsnittskonsentrasjonen skal endre seg mindre enn utgangsgjennomsnittet \pm tillatt systematisk avvik (tillatt bias)
2. Konsentrasjonen i den enkelte prøve skal endre seg mindre enn utgangsverdi \pm tillatt totalfeil. (28)

Holdbarhetsanalyser utføres på to måter: (1) Buksemetoden og (2) Batch-metoden. (29)

Buksemetoden

Buksemetoden benyttes om det er usikkert om prøvene kan oppbevares stabilt (frysing for eksempel) før analysering. Prøvene blir med denne metoden analysert dag for dag, og prøvene som benyttes hentes fra rutinen. (28) For å kontrollere at det ikke er endringer i metoden fra dag til dag analyseres blant annet kontroller. På den måten er man sikker på at det er analytten som har endret seg, ikke metoden. (29)

Metoden krever at variasjonskoeffisient (CV) eller standardavvik (s) samt krav for tillatt bias og tillatt totalfeil er kjent. I tillegg bør testen utføres relativt ofte, og testen er best egnet for testing av få modaliteter. (28)

Batch-metoden

Metoden egner seg godt om analytten er holdbar ved en spesiell oppbevaring (nedfrysing for eksempel) (28) Batch-metoden baserer seg på at man tar mange prøver av ulike individer og deler disse inn i like mange alikvoter som antall kombinasjoner av oppbevaringsbetingelser og -tider. Etter at man har samlet og fryst ned alle alikvoter analyseres de samlet. Da vil man ha akkurat de samme variasjonene i analysen, og man kan se vekk fra analytisk variasjon når svarene skal vurderes. (29)

For prøver fra ett individ vil det si at verdien man får ved «tidspunkt null» (utgangsverdi) settes som 100 %. For de neste batchene fra samme individ settes måledataene lik 100 % \pm %-

endring fra utgangsverdi. (28) Økt verdi vil gi en prosentverdi $> 100 \%$, mens en lavere verdi vil gi en prosentverdi $< 100 \%$.

Vurdering av endringer

Etter analyse finner man en gjennomsnittlig endring for alle prøvene oppbevart ved samme tid og med samme oppbevaringsbetingelser, og dette estimeres med et 90 %-konfidensintervall. Grensene for dette konfidensintervallet sammenlignes med akseptområde ($100 \% \pm$ tillatt bias), og kan få ett av tre utfall:

1. Hele konfidensintervallet er innenfor akseptområdet.
2. Hele konfidensintervallet ligger utenfor akseptområdet.
3. Konfidensintervallet krysser én eller begge grenser.

Punkt 1 og 2 vil gi 95 % sikkerhet for at prøvematerialet er holdbart/ikke holdbart. Punkt tre sår tvil om holdbarheten, og man kan derfor vurdere å utvide testen om ønskelig. (28)

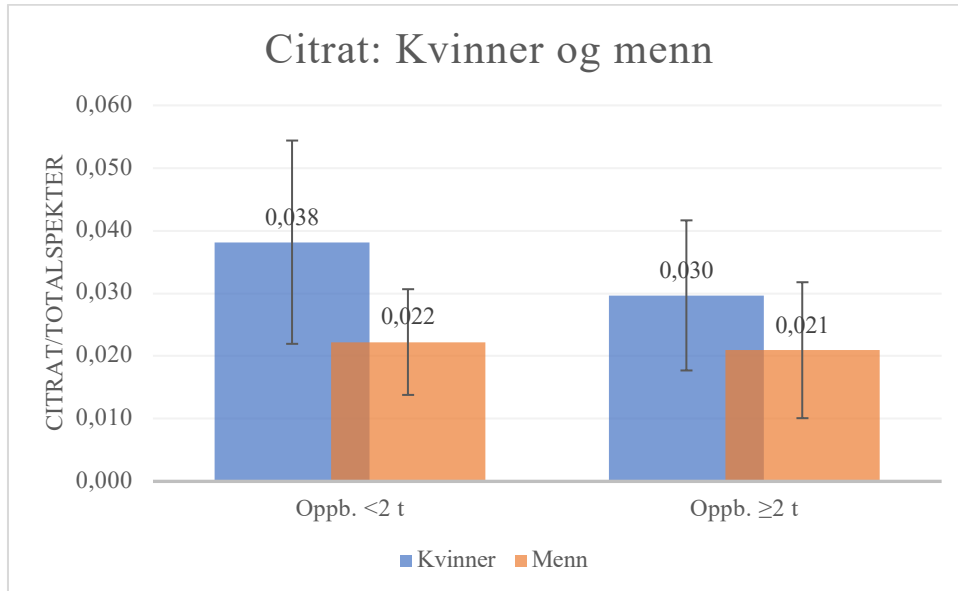
Antall prøver

Jo flere prøver som inkluderes i et holdbarhetsforsøk, jo smalere og sikrere blir 90 %-konfidensintervallet for målt gjennomsnittsverdi. Ved vurdering av gjennomsnittsendringer holder det som regel med 10-30 prøver, men av hensyn til enkeltverdier anbefales ikke bruk av mindre enn 20 prøver. Om 90 %-konfidensintervallet krysser en av akseptgrensene selv om gjennomsnittsverdien er innenfor, kan forsøket utvides for å innsnevre konfidensintervallet. Det samme gjelder om én eller flere av enkeltverdiene ligger utenfor tillatt totalfeil. (28)

Vedlegg 4: Grafisk fremstilling av resultater

Resultat for citrat

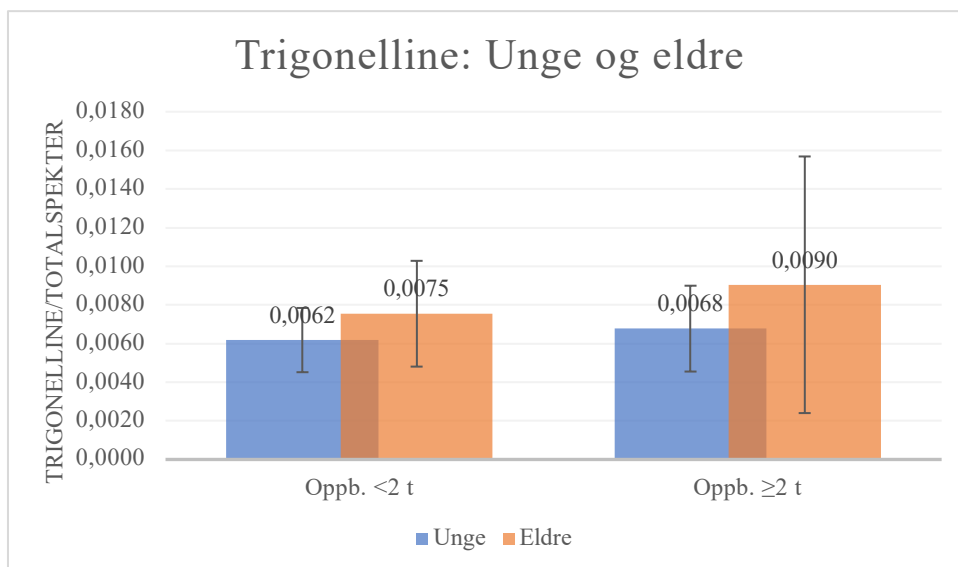
Figur 4 viser gjennomsnittsverdier for citrat for kvinner og menn oppbevart < 2 timer og ≥ 2 timer før frys med standardavvik.



Figur 4: Grafisk fremstilling av gjennomsnittsverdier (normalisert mot totalspektrumet) for citrat for kvinner og menn oppbevart < 2 timer og ≥ 2 timer før frys vist med standardavvik.

Resultat for trigonelline

Figur 5 viser gjennomsnittsverdier for trigonelline for unge og eldre oppbevart < 2 timer og ≥ 2 timer før frys med standardavvik.



Figur 5: Grafisk fremstilling av gjennomsnittsverdier (normalisert mot totalspektrumet) for trigonelline for unge og eldre oppbevart < 2 timer og ≥ 2 timer før frys vist med standardavvik.

Vedlegg 5: Psoriasis og psoriasisartritt

En av de viktigste oppgavene immunforsvaret vårt har er å kunne skille mellom kroppsegne og fremmede strukturer. For den ervervede immuniteten er det nødvendig at lymfocytene er immunkompetente, slik at de kan gjenkjenne og reagere kun med fremmede antigener. I kroppen er det kun lymfocytene som har slike egenskaper. Om lymfocytene er aktivert til å reagere med kroppsegne strukturer og vev kalles det for autoimmunitet. Det vil føre til skader i kroppen, og kalles en autoimmun sykdom. (30)

For at immunsystemet skal kunne aktiveres av kroppens egne peptider må de bli presentert for lymfocytene i en ekstremt høy konsentrasjon, og sjansen for at dette skjer er veldig liten. Hvis man antar at mekanismene for toleranseutvikling som regel virker slik det skal, vil det dermed være en svært liten sannsynlighet for utvikling av autoimmune sykdommer. Likevel viser det seg at omtrent 5-7 % av verdens befolkning har en autoimmun sykdom av en eller annen grad. (30)

Autoimmune sykdommer deles grovt sett inn som *organspesifikke* eller *systemiske autoimmune sykdommer*. Ved en organspesifikk autoimmun sykdom vil immunresponsen være rettet mot et vevs- eller organspesifikt antigen. Ved en systemisk autoimmun sykdom er som oftest målantigenet svært utbredt og vil være tilstede mange steder i kroppen. (30)

Psoriasis er en slik systematisk kronisk inflammatorisk autoimmun sykdom som rammer omtrent 1-3 % av befolkningen. (31) Første gangs utbrudd kommer ofte i tenårene, og sykdommen kjennetegnes av utbrudd som kommer og går med stadige forbedringer og forverringer. Man tror at sykdommen kommer av unormal aktivering av T-celler, og at den er av genetisk opphav. (32) Sykdommen er som nevnt hovedsakelig mediert av T-celler og dendrittiske celler med komplekse systemer for «feedback» fra blant annet antigenpresenterende celler og nøytrofile granulocytter. Signaler mellom det medfødte og ervervede immunsystemet mediert av cytokiner, inkludert TNF α , interferon γ , and interleukin-1, er av interesse ved forskning på psoriasis. TNF α induserer sekundære mediatorer og adhesjonsmolekyler, som har blitt funnet å være delaktig i psoriatisk sykdom. (31)

De immunologiske endringene vil på cellulært nivå føre til økt proliferasjon av keratinocytter, og dermed gi en fortykning av dermis og epidermis. (33) Ved psoriasis tar det omtrent fire

dager for en hudcelle å lages, støtes opp til overhuden og avstøtes, mens det hos en frisk person tar rundt fire uker. Dette fører til de typiske psoriasisplakkene, da huden ikke rekker å modnes og avstøtes på normal måte. (34)

For psoriasis finnes det tre hovedtyper behandling; behandling med UV-lys, behandling med salver og systemisk behandling. Pasienter som er kandidater for behandling med UV-lys har gjerne en mer alvorlig form for psoriasis, eller psoriasis lokalisert steder på kroppen som påvirker livskvalitet i stor grad. For pasienter med et mildt til moderat sykdomsbilde er behandling salver et alternativ. Salver kan også brukes i tillegg til behandling med UV-lys for pasienter med moderat til alvorlig psoriasis. Høypotente steroider og vitamin D-analoger blir mye brukt i behandling med salver. De siste årene har man gått mer bort fra systemisk behandling av psoriasis, men det blir fortsatt brukt da det administreres oralt og regnes som kostnadseffektivt. (35)

Det er funnet at bortimot 30 % av pasienter med psoriasis har også psoriasisartritt (PsA). (36) PsA er definert som en inflammatorisk artritt, ofte seronegativ, assosiert med psoriasis. PsA kunne skilles klinisk fra revmatoid artritt (RA) da revmatoid faktor (RF) ble oppdaget i 1948. (37) PsA er en form for artritt som typisk rammer ledd i hender og føtter, men det kan også ramme større ledd eller områder med sener forbundet med ben. Dette kan for eksempel være hofter, ankler, knær og nedre del av ryggen. Betennelsen som forekommer kan også ramme senene. De viktigste symptomene er stive, hovne og såre ledd i de områder man er utsatt. (38)

