

BAIBA

DE VRIJZETTING VAN BAIBA TEN GEVOLGE VAN EEN FYSIEKE INSPANNING

Lauren Van Cauwenberghe

Studentennummer: 01106408

Promotor: Prof. dr. Wim Derave

Begeleider: Jan Stautemas

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de richting lichamelijke opvoeding
en bewegingswetenschappen

Academiejaar: 2016 - 2017

Voorwoord

Tijdens mijn studies ben ik vooral geïnteresseerd geraakt in gezondheid gerelateerde effecten van fysieke activiteit. Gedurende mijn bacheloropleiding kwam ik als proefpersoon reeds in contact met het onderzoek van Jan Stautemas rond de release van BAIBA bij fysieke inspanning. Het was dan ook boeiend om mijn masterproef te kunnen schrijven in het kader van datzelfde onderzoek. Ik wil Jan Stautemas graag bedanken voor deze kans en voor zijn goede begeleiding.

Daarnaast had ik graag ook een woord van dank uitgesproken voor Prof. Derave voor zijn deskundige feedback op de cruciale momenten en voor Mr. Van Kuilenburg voor zijn bijdrage aan het onderzoek.

Last but not least wil ik mijn vrienden en mijn familie bedanken. In het bijzonder wil ik mijn vriend Kenneth bedanken voor zijn steun en luisterend oor, André Vansteenbrugge voor het nalezen van mijn masterproef en mijn mama omdat ze mijn klankbord wou zijn.

INHOUDSTABEL

Voorwoord	3
Abstract	6
1. Literatuurstudie	8
1.1. SITUERING	8
1.2. β -AMINOISOBUTYRIC ACID	9
1.2.1. Wat is BAIBA	9
1.2.2. Voorkomen	10
1.2.3. Metabolisme	10
1.2.4. Hyper-BAIBA-trait.....	15
1.2.5. Functies	18
1.3. INVLOED VAN FYSIEKE ACTIVITEIT OP BAIBA.....	25
1.3.1. BAIBA als myokine	25
1.4. PROBLEEMSTELLING.....	30
1.5. ONDERZOEKSVRAGEN.....	31
1.5.1. Eerste onderzoeksvraag	31
1.5.2. Tweede onderzoeksvraag	31
1.5.3. Derde onderzoeksvraag	31
2. Methode.....	32
2.1. STUDIEDESIGN	32
2.1.1. Fase 1: screening	32
2.1.2. Fase 2: testen	33
2.2. PROCEDURE & MEETINSTRUMENTEN	36
2.2.1. DNA-analyse	36
2.2.2. Bloedafname.....	38
2.2.3. Urineafname	38
2.2.4. Bloed en urineanalyse.....	39
2.3. STATISTISCHE ANALYSE	41
3. Resultaten	42
3.1. TOTALE BAIBA-CONCENTRATIE	43
3.1.1. BAIBA-concentratie in het plasma	43
3.1.2. BAIBA-concentratie in urine	47
3.2. VERHOUDING S- EN R-BAIBA	51

3.2.1. Verhouding van S- en R-BAIBA in het plasma	51
3.2.2. Verhouding van S- en R-BAIBA in urine	52
3.3. R-BAIBA-CONCENTRATIE.....	55
3.3.1. R-BAIBA in het plasma	55
3.3.2. R-BAIBA in de urine.....	56
3.3.3. Overgang van R-BAIBA-concentratie van plasma naar urine	57
3.4. S-BAIBA-CONCENTRATIE	59
3.4.1 S-BAIBA in het plasma.....	59
3.4.2. S-BAIBA in de urine	61
3.4.3. Overgang van S-BAIBA-concentratie van plasma naar urine.....	63
4. Discussie.....	65
4.1. BEPERKINGEN IN HET ONDERZOEK	75
4.2. VERDER ONDERZOEK.....	76
5. Conclusie	78
Bijlage	79
Referenties.....	84

Abstract

Doelstelling – In het kader van gezondheid gerelateerde effecten werd β -aminoisobutyric acid (BAIBA) recent als mogelijke myokine voorgesteld wegens de invloed die het aminozuur heeft op metabole functies en doordat de concentratie van BAIBA stijgt na chronische aerobe fysieke inspanningen (Roberts et al., 2014). Om BAIBA als een myokine te kunnen erkennen, wordt in deze masterproef nagegaan of er een stijging in BAIBA-concentratie is onder invloed van een acute fysieke inspanning. De totale BAIBA-concentratie bestaat echter uit de samenstelling van de twee enantiomeren R-BAIBA en S-BAIBA die elk hun eigen metabolisme hebben, waardoor de invloed van een acute fysieke inspanning op S-BAIBA en R-BAIBA afzonderlijk zal worden nagegaan. Als laatste kan een polymorfisme in het AGXT2-gen een wijziging in de BAIBA-concentratie teweegbrengen aangezien de afbraak van R-BAIBA hierdoor gewijzigd wordt. De invloed van het polymorfisme op de BAIBA-concentraties tijdens een acute fysieke inspanning wordt nagegaan door proefpersonen met een verschillend genotype met elkaar te vergelijken en om op die manier meer te weten te komen over het mechanisme van BAIBA.

Methode – 15 proefpersonen die gerekruteerd werden op basis van hun rs37369 genotype werden opgenomen in een experimentele studie met een gerandomiseerd cross-over design waarbij ze enerzijds een acute aerobe fysieke inspanning uitvoerden van één uur tegen 40% van de Wmax en anderzijds een rustdag hadden ter controle. Op beide testdagen werden bloed- en urinestalen genomen op verschillende tijdstippen en nadien werden telkens de R-BAIBA- en de S-BAIBA-concentraties gemeten en op basis daarvan werd de totale BAIBA-concentratie berekend.

Resultaten – BAIBA steeg in het plasma onder invloed van een acute fysieke inspanning, waarbij zowel de R-BAIBA- als de S-BAIBA-isomeer steeg ten opzichte van de rustconditie, maar enkel bij R-BAIBA werd een significant hogere concentratie vastgesteld na één uur fietsen in vergelijking met de rustconditie. In urine werd geen wijziging in concentratie gevonden na inspanning zowel bij R- als bij S-BAIBA. Tussen de verschillende groepen gebaseerd op het genotype was er geen verschil in R- en S-BAIBA-verloop onder invloed van een acute fysieke inspanning zowel in plasma als in urine, terwijl er op baseline wel al een verschil in R-BAIBA-concentratie was tussen de verschillende rs37369 genotypes.

Conclusie - BAIBA kan op basis van deze studie beschouwd worden als een myokine, want naast de effecten die BAIBA uitoefent op het metabolisme werd nu ook een stijging in concentratie vastgesteld onder invloed van een acute fysieke inspanning. Meer specifiek gaat dit over de R-BAIBA-enantiomeer die voor 98% van de totale BAIBA-concentratie bepaalt. S-BAIBA kan op basis van dit onderzoek niet als een myokine erkend worden aangezien de acute fysieke inspanning geen hogere concentratie oplevert dan in rust, maar verder onderzoek met andere inspanningsintensiteiten is nodig. Het genotype bepaald door een SNP op rs37369 zorgt niet voor een verschillend verloop in R- en S-BAIBA onder invloed van een acute fysieke inspanning, wat erop wijst dat het AGXT2-enzym een minder significante invloed heeft op het mechanisme van R-BAIBA na inspanning dan in rust.

1. Literatuurstudie

1.1. SITUERING

De prevalentie van obesitas is wereldwijd verdubbeld sinds 1980. In 2014 kampte ongeveer 39% van de volwassen populatie met overgewicht, waarvan 13% obesitas had. Dit zijn data van de wereldgezondheidsorganisatie (WHO) die aantonen dat de stijging in obesitas een wereldwijd gezondheidsprobleem vormt. Obesitas gaat namelijk vaak gepaard met andere ziektes. Zo is er een grote kans op comorbiditeit met diabetes 2, atherosclerose en/of een degeneratieve botziekte. De kwaliteit van het leven daalt drastisch en na enige tijd leidt dit bij een groot aantal mensen tot de dood (Nicklas en O'Neil, 2013).

Het grootste probleem bij overgewicht en obesitas is het enorme vetgehalte dat voor metabole problemen zorgt. Ter preventie en behandeling van obesitas en diabetes type 2 wordt vandaar vaak een aangepast voedingspatroon gecombineerd met een fysieke interventie, om de energiehomeostase terug op peil te krijgen. Enerzijds wordt de energie-inname beperkt door minder te consumeren en/of door minder calorierijke voeding te eten. Anderzijds wordt het energieverbruik opgedreven door aan fysieke activiteit te doen. De activatie van de skeletspieren tijdens die fysieke inspanningen zorgt namelijk voor een verhoogde mitochondriale biogenese, vrije-vetzuuroxidatie en glucosetransport, wat tot een verbeterde metabole werking leidt. Er zal met andere woorden meer energie verbrand worden, wat uiteindelijk tot een daling in vetmassa zal leiden (Lin et al., 2002; Michael et al., 2001; Wu et al., 1999).

Roberts et al. (2014) erkenden de mogelijke rol van BAIBA binnen het energieverbruik na een reeks fysieke inspanningen. De molecule zou namelijk vrijgezet worden door fysieke inspanningen en zou tevens een positief effect hebben op het metabolisme. Hieruit concludeerden ze dat activatie van spieren, via BAIBA voor een verbetering in metabole werking zou kunnen zorgen. In de thesis zal eerst dieper ingegaan worden op de molecule BAIBA: een beschrijving van wat BAIBA is, het metabolisme en de verschillende functies ervan. Nadien wordt de invloed van fysieke activiteit op BAIBA besproken, om uiteindelijk te onderzoeken of BAIBA effectief wordt vrijgezet na een acute fysieke inspanning bij mensen.

1.2. β -AMINOISOBUTYRIC ACID

1.2.1. Wat is BAIBA

BAIBA staat voor β -aminoisobutyric acid, ook wel β -aminoisobutyrate, (L-)3- aminoisobutyric acid of β -aminoboterzuur genoemd. Het heeft zijn naam van β -aminozuur te danken aan de aminogroep (NH_2) die zich op het tweede koolstofatoom (bèta) bevindt. Verder zit er nog een carboxylgroep (COOH) en een methylgroep op het eerste, alfa koolstofatoom (fig. 1). Het aminozuur werd reeds begin de jaren '50 ontdekt door Crumpler et al. en door Fink et al. in respectievelijk 1951 en 1952. Ze vonden het aminozuur in urine van ratten en mensen. Nadien werd BAIBA ook in serum geïdentificeerd door Solem et al. in 1974. Het is echter in 2014 in een recente studie van Roberts et al. dat baanbrekend werk geleverd werd rond de molecule, BAIBA werd hierbij als een kleine myokine geïdentificeerd.

Uit verscheidene studies is verder gebleken dat BAIBA twee verschillende vormen kan aannemen. Er wordt namelijk een onderscheid gemaakt tussen een R- en een S-isomeer. Ze hebben hetzelfde aantal en dezelfde soort atomen, maar zijn anders geschikt. De methylgroep en het waterstofatoom op het alfa koolstofatoom zijn namelijk omgekeerd geplaatst. R-BAIBA werd het eerst ontdekt omdat het dominant is in urine. Enkele jaren later werd S-BAIBA onderscheiden van de R-isomeer met behulp van gas-liquid chromatografie (Solem et al., 1974).

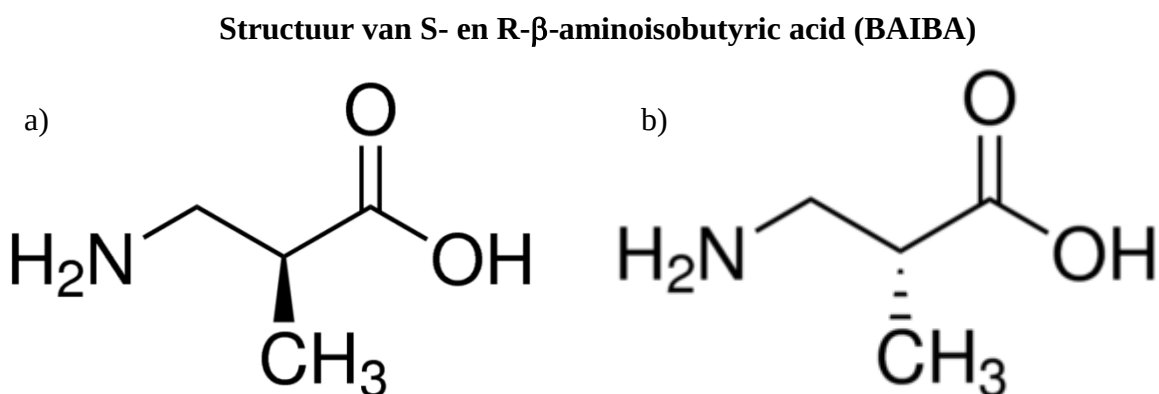


Fig. 1. Chemische structuur van S-aminoisobutyric acid (a) en R- β -aminoisobutyric acid (b) (naar Ginter and Simko, 2014).

1.2.2. Voorkomen

In de eerste studies van Crumpler et al. (1951) en Fink et al. (1952) werd vastgesteld dat de concentratie van BAIBA intra-individueel vrij constant is, naast kleine schommelingen van dag tot dag. Interindividueel werden echter wel extreme verschillen gevonden. Afhankelijk van de omgeving en/of de genen kan er met andere woorden een groot verschil optreden (Cartler et al., 1956 en Harris, 1953). Zo hebben Kaukasische volkeren over het algemeen een lage BAIBA-uitscheiding, terwijl Aziatische volkeren over het algemeen een hogere BAIBA-uitscheiding hebben (Garn, 1961). Verder in de thesis, in het deel over hyper-BAIBA-trait, wordt een mogelijke verklaring gegeven voor de interindividuele verschillen.

R-BAIBA komt tot 50 maal meer voor in urine dan de S-isomeer (Solem et al., 1974). Over de verhouding R:S in het bloed is er echter wat onenigheid binnen de studies. In het onderzoek van Solem et al. (1974) was S-BAIBA dominant en kwam 4 keer meer voor dan R-BAIBA. Dit werd echter tegengesproken in de studie van Fumitake et al. (1976), waarin de R-isomeer dominant was in het bloed, met een ratio van 1,13:1. In de studie gaven ze aan dat de discrepantie mogelijks te verklaren viel door een verschillende oorsprong van subjecten, wat opnieuw de interindividuele verschillen aantoont.

1.2.3. Metabolisme

Hieronder wordt het metabolisme van BAIBA besproken: eerst de verschillende manieren waarop BAIBA geproduceerd kan worden, daarna hoe BAIBA wordt afgebroken en kort wat er gebeurt met de afbraakproducten.

1.2.3.1. Aanmaak van BAIBA

Om na te gaan of een bepaald product voor de aanmaak van BAIBA zorgde, wordt vaak gebruik gemaakt van labeling. In het geval van BAIBA wil dit zeggen dat het koolstofatoom van het product dat werd toegevoegd, vervangen werd door een isotoop. Als dit verzwaarde koolstofatoom na toediening ook teruggevonden werd in BAIBA, wees dit erop dat BAIBA effectief voortkwam uit dat product. Thymine en valine waren zulke producten en zij worden hieronder besproken.

Aanmaak van BAIBA door Thymine

Al vanaf de ontdekking van BAIBA speculeerden de onderzoekers over de afkomst van de molecule. Fink et al. (1952) en Crumpler et al. (1951) gaven aan dat thymine een mogelijke precursor kon zijn voor de aanmaak van BAIBA. In verdere studies werd deze hypothese getoetst. BAIBA kwam hieruit als afbraakproduct van thymine (Fink et al., 1952) (fig. 2). Solem (1974) toonde in zijn onderzoek aan dat de afbraak van pyrimidines, en meer specifiek thymine, enkel voor een stijging in R-BAIBA zorgde en niet in S-BAIBA. Dit wees erop dat enkel R-BAIBA een afbraakproduct is van thymine en dat S-BAIBA van elders komt.

Aanmaak van BAIBA door Valine

In een onderzoek van Kupiecki en Coon (1957) werd echter aangetoond dat BAIBA naast katabolisme van pyrimidines ook gevormd kan worden uit katabolisme van valine (fig. 2). In een studie van Robinson et al. (1957) werd S-methylmalonaat semialdehyde (S-MMSA) reeds als intermediaire van valine vastgesteld. Kupiecki en Coon (1957) toonden hierna de relatie tussen S-MMSA en BAIBA aan. Dit aan de hand van de transaminasereactie van S-MMSA met glutamaat door het GABA transaminase enzym, ook wel ABAT (4-aminobutyrate aminotransferase) genoemd. De amino-groep op glutamaat werd namelijk gewisseld met de keto-groep op S-MMSA waarbij BAIBA en α -ketoglutarate gevormd werden. De reactie kon ook in de andere richting plaatsvinden. Hieruit kon uiteindelijk besloten worden dat BAIBA en meer specifiek S-BAIBA ook gevormd kan worden uit katabolisme van valine (Mushahwar et al., 1967). Congdon et al. toonde in 1981 namelijk aan dat de degradatie van valine specifiek voor S-BAIBA zorgt.

Hieruit blijkt nu dat de aanmaak van R- en S-BAIBA verschillend verloopt. R-BAIBA wordt enerzijds gevormd vanuit het katabolisme van thymine en S-BAIBA anderzijds vanuit de afbraak van valine.

Thymine en valine katabolisme leiden respectievelijk tot productie van R- en S-BAIBA

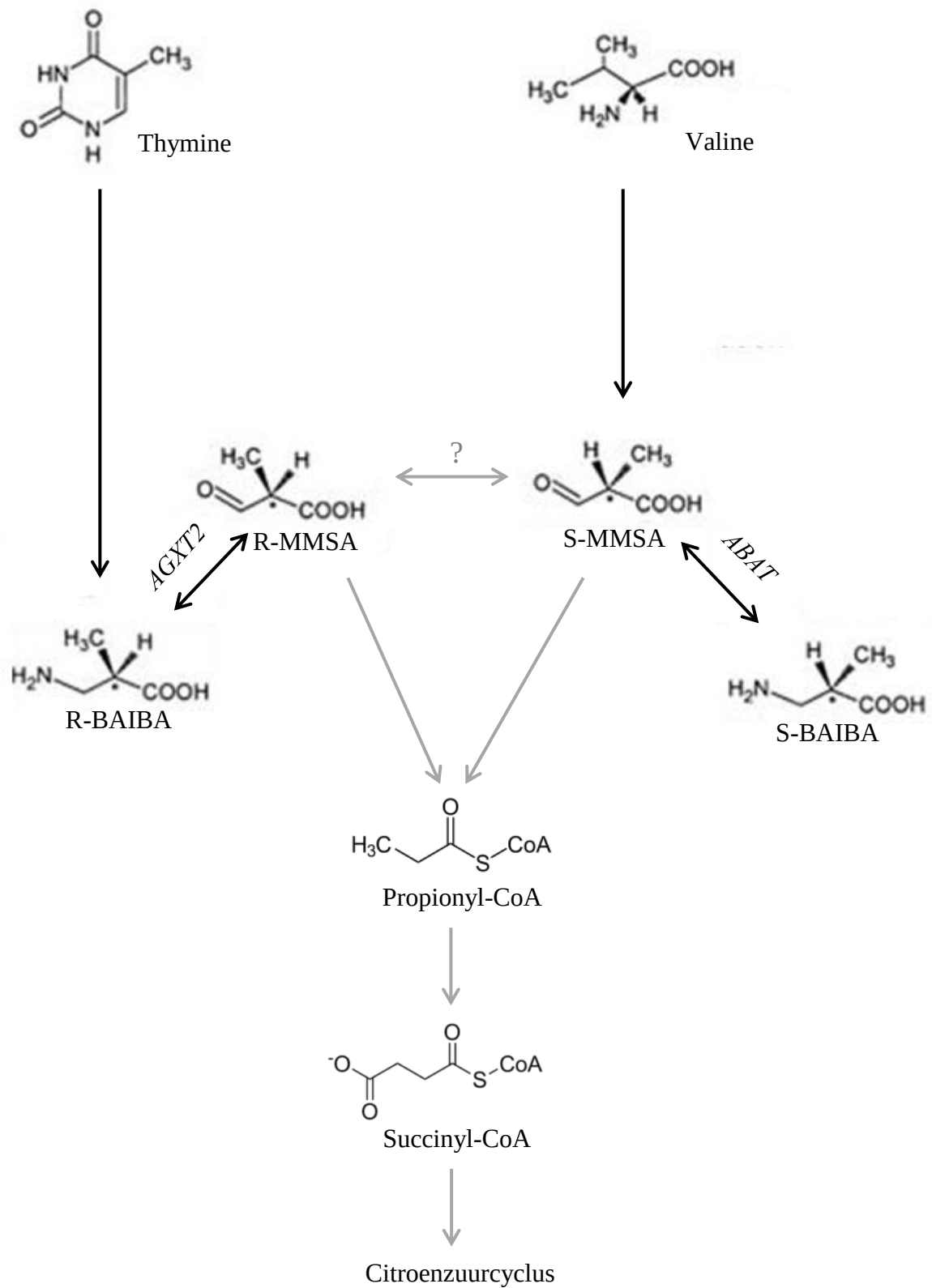


Fig. 2. Metabole wegen van thymine en valine die tot in de citroenzuurcyclus leiden en waarbij R-BAIBA en S-BAIBA respectievelijk gevormd worden (naar van Kuilenburg et al., 2004 en Marcadier et al., 2013).

1.2.3.2. Afbraak van BAIBA

Net zoals bij de aanmaak van R- en S-BAIBA is er een verschil in afbraak van de twee enantiomeren. Ze ondergaan wel allebei deaminatie, maar met behulp van een verschillend enzym.

In 1969 werd een enzym geïdentificeerd dat instond voor het katabolisme van R-BAIBA (Kakimoto et al., 1969). Het enzym met EC-code 2.6.1.40 werd β -aminoisobutyrate-pyruvate aminotransferase genoemd naar de transaminasereactie die het katalyseert, namelijk van R-BAIBA met pyruvaat. Enkele jaren later werd echter aangetoond dat alanine-glyoxylaat aminotransferase 2 het eigenlijke enzym is dat instaat voor het katabolisme van R-BAIBA (Kontani et al., 1993). AGXT2 katalyseert aldus de reactie van R-BAIBA met pyruvaat, waarbij R-MMSA en alanine uit voort komen (fig. 3).

Bij de aanmaak van S-BAIBA werd reeds de transaminasereactie weergegeven die S-MMSA omzet naar S-BAIBA. ABAT is het verantwoordelijke enzym hiervoor en kan er eveneens voor zorgen dat S-BAIBA via deaminatie opnieuw wordt omgevormd naar S-MMSA (fig. 3) (Van Gennip et al., 1981).

Afbraak van R-BAIBA leidt aldus tot R-MMSA en afbraak van S-BAIBA tot S-MMSA. De methylmalonyl semialdehydes worden nadien verder gemetaboliseerd door methylmalonaat semialdehyde dehydrogenase naar propionyl-CoA en komen op die manier, via succinyl-CoA in de citroenzuurcyclus terecht (fig. 2) (Marcadier et al., 2013).

1.2.3.3. Correlatie tussen R- en S-BAIBA

In het onderzoek van Van Gennip et al. (1981) werd ondanks de verschillende aanmaak van R-BAIBA en S-BAIBA een constante ratio gevonden tussen beide isomeren, wat wijst op een mogelijke correlatie. Verdere evidentie werd in het onderzoek gevonden na toediening van thymine, die niet enkel voor een stijging in R-BAIBA zorgde, maar ook voor een heel lichte stijging in S-BAIBA in urine (Van Gennip et al., 1981). Dit is in tegenstelling tot bevindingen uit voorgaande onderzoeken, waarin thymine enkel de R-BAIBA-concentratie verhoogde (Solem, 1974). Van Gennip et al. gaven als mogelijke verklaring dat R-BAIBA omgezet kan worden naar S-BAIBA. Uit het onderzoek van Kontani et al. (1993) is reeds gebleken dat R-BAIBA via een transaminasereactie omgezet kan worden naar R-MMSA, ook S-BAIBA kan omgezet worden naar S-MMSA via een transaminasereactie (Kupiecki en Coon, 1957). De enige stap die ontbreekt is die van R-MMSA naar S-MMSA of omgekeerd.

Tamaki et al. (1990) beweren dat de grotere activiteit van de transaminase die S-BAIBA kan omzetten naar S-MMSA dan de transaminase die R-BAIBA kan omzetten naar R-MMSA en de hogere R-BAIBA-concentratie in de urine erop wijzen dat er eerder een omzetting van S-MMSA naar R-MMSA zou zijn. De vraag blijft aldus of er omzetting mogelijk is van R-MMSA naar S-MMSA en/of omgekeerd van S-MMSA naar R-MMSA en of dit spontaan gebeurt of via een racemase enzym (fig. 2).

Transaminasereactie tussen S-BAIBA en S-MMSA enerzijds en R-BAIBA en R-MMSA anderzijds

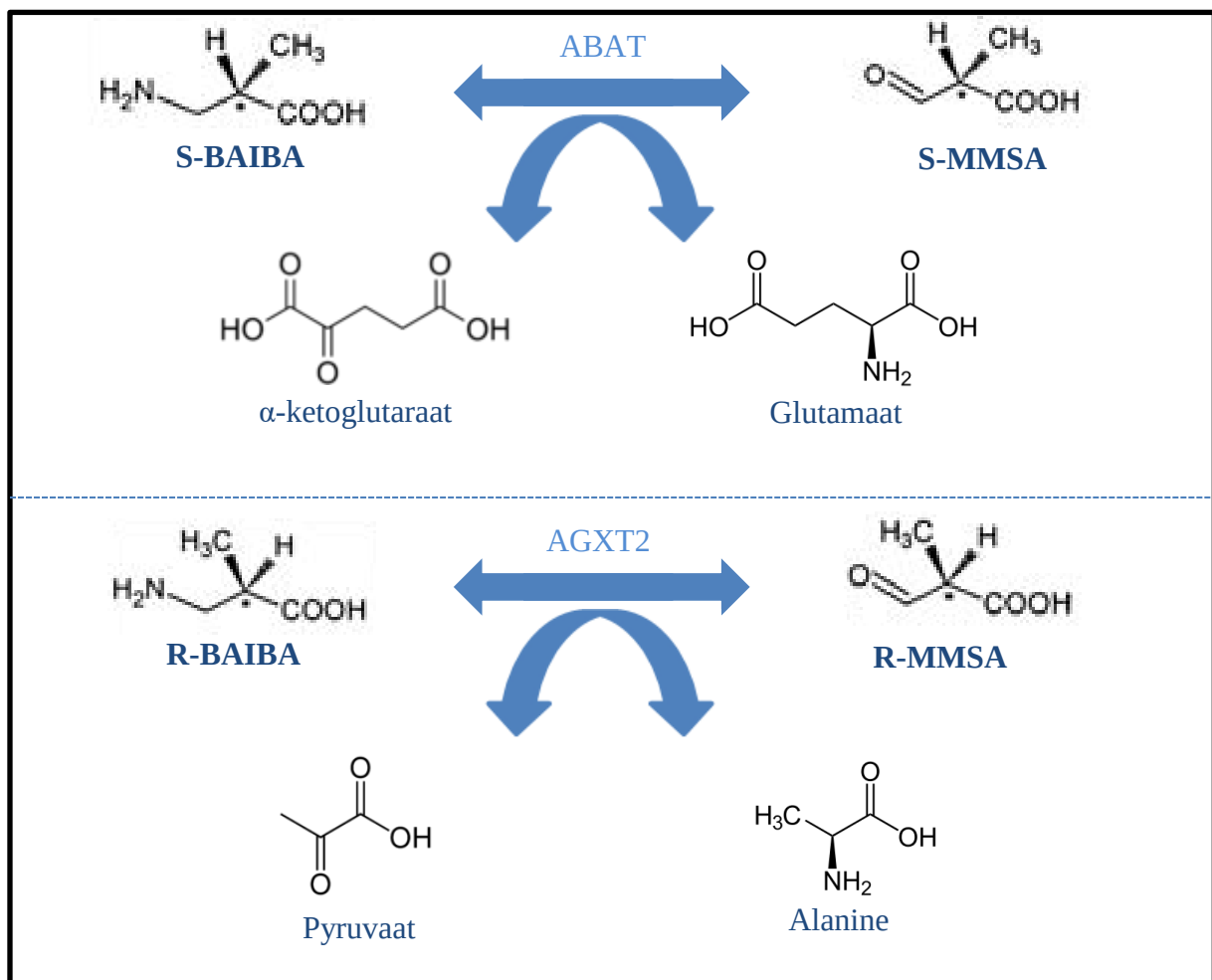


Fig. 3. Transaminase reactie van S-BAIBA met α -ketoglutaaraat door ABAT waarbij S-MMSA en glutamaat gevormd worden en omgekeerd (naar Kupiecki en Coon, 1957). Transaminase reactie van R-BAIBA met pyruvaat door AGXT2 waarbij R-MMSA en alanine gevormd worden en omgekeerd (naar Kakimoto et al., 1969).

1.2.4. Hyper-BAIBA-trait

In het deel ‘voorkomen’ van de thesis, werd reeds aangehaald dat sommige mensen meer BAIBA uitscheiden dan anderen. Bij een hoge uitscheiding, van boven de 79 $\mu\text{g}/\text{mg}$ creatinine ongeveer, spreekt men van hyper-BAIBA-trait (Yanai et al., 1969).

Armstrong et al. (1963) speculeerden dat een hoge BAIBA-concentratie in de urine veroorzaakt werd door de onmogelijkheid om de molecule verder af te breken. Kakimoto et al. (1969) bevestigden dit in hun studie door aan te tonen dat er een deficiënte werking van het AGXT2-enzym was in de hyper-BAIBA-trait patiënten. Aangezien AGXT2 instaat voor de afbraak van R-BAIBA, leidt een deficiënte werking hiervan tot een accumulatie van het R-BAIBA-substraat. De oorzaak voor die deficiënte werking, en aldus de verhoogde BAIBA-concentratie, werd gevonden in de studie van Suhre et al. (2011). Op chromosoom 5 werd namelijk het AGXT2-gen teruggevonden, dat codeert voor het AGXT2-enzym. Zoals overal in het DNA kunnen ook hier enkelvoudige nucleotide polymorfismen (SNP) voorkomen, wat inhoudt dat een nucleotide vervangen wordt door een andere nucleotide. SNP rs37369, SNP rs37370 en SNP rs180749 werden hierbij gedetecteerd (Yoshino et al., 2014). In deze thesis zal enkel SNP rs37369 behandeld worden omdat deze in vergelijking met de andere twee polymorfismen het meest voorkomt binnen de Europese populatie (www.ensembl.org) en tevens de hoogste correlatie vertoont met de BAIBA-concentratie (Suhre et al., 2011). Het nucleotide cytosine wordt hierbij vervangen door thymine, dat zich op het AGXT2-gen bevindt (Suhre et al., 2011). Het SNP zorgt hierdoor voor een wijziging in de codering waardoor het aminozuur isoleucine gevormd wordt in de plaats van valine. Dit levert een foute aanmaak van het AGXT2-enzym op en aldus een deficiënte werking ervan, met als gevolg dat R-BAIBA minder wordt afgebroken en in hoge concentraties te vinden is in de urine (Suhre et al., 2011).

Harris (1953) gaf reeds in de jaren ‘50 aan dat hyper-BAIBA-trait een autosomaal recessieve erfelijkheidsfactor is, aan de hand van familiestudies. Dit wil zeggen dat een homozygoot van het recessief allel voor een verhoogde BAIBA-uitscheiding zorgt. In het geval van SNP rs37369 is het cytosineallel dominant en het thymineallel recessief, waarbij homozygoten van het thymineallel (TT) een deficiënte werking krijgen van het AGXT2-enzym en aldus een hoge BAIBA-uitscheiding hebben. De waarden kunnen hierbij oplopen tot meer dan 600 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ creatinine. Bij heterozygoten (CT) en bij homozygoten van het dominant allel (CC) liggen de waarden beduidend lager, respectievelijk rond 200 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ creatinine en 60 $\mu\text{mol}/\text{mg}$

creatinine (Yoshino et al., 2014). Hieronder in figuur 4 worden de waarden van de BAIBA-uitscheiding weergegeven afhankelijk van het hebben van SNP rs37369 of niet, waarbij echter wel een merkbare discrepantie zichtbaar is tussen de waarden van BAIBA-uitscheiding tussen de verschillende studies.

BAIBA-uitscheiding afhankelijk van het hebben van SNP rs37369 of niet

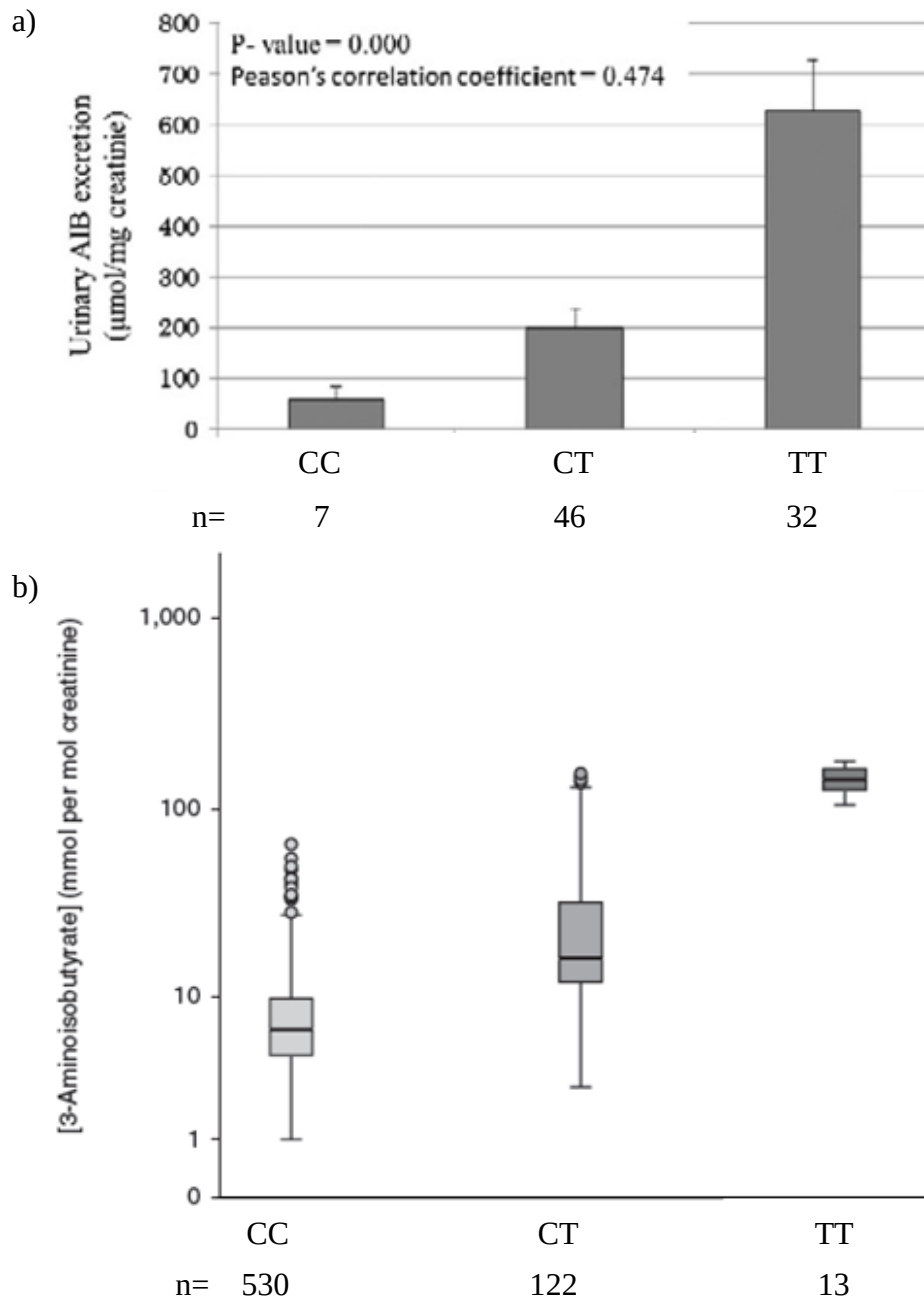


Fig. 4. BAIBA-uitscheiding bij homozygoten van het dominante cytosineallel (CC), bij heterozygoten (CT) en bij homozygoten van het recessief thymineallel (TT). a) uitgedrukt in $\mu\text{mol/mg}$ creatinine b) uitgedrukt in mmol/mol creatinine op een logaritmische schaal (naar Yoshino et al., 2014 en Suhre et al., 2011)

Er werd reeds in het begin van de thesis vastgesteld dat de meerderheid van de wereldbevolking een lage BAIBA-uitscheiding heeft en slechts een minderheid hoge BAIBA-waarden vertoont in de urine. Dit stemt overeen met de resultaten uit IGSR (The International Genome Sample Resource) waaruit gebleken is dat 39% van de wereldbevolking een T allel heeft en 21% twee T allelen heeft en aldus homozygoot (TT) is (fig. 5). Hierdoor is bij een minderheid van de wereldbevolking een AGXT2-deficiëntie te vinden die gepaard gaat met een verminderde R-BAIBA-afbraak en een verhoogde R-BAIBA-concentratie in de urine. Vooral in Afrika en in Oost-Azië zijn er veel mensen met een T allel, namelijk 63% in Afrika en 57% in Oost-Azië en waarbij respectievelijk 41% en 33% homozygoot (TT) is en 44% en 49% heterozygoot (CT) is. In die gebieden valt er aldus een hogere BAIBA-uitscheiding waar te nemen dan in Amerika, Zuid-Azië en Europa, waar het polymorfisme minder voorkomt en er op die manier minder homozygoten zijn waarvan het AGXT2-enzym niet goed werkt (www.ensembl.org). Dit verklaart tevens waarom Garn (1961) in zijn studie een hogere BAIBA-uitscheiding vond bij de Aziatische volkeren in vergelijking tot de Kaukasische volkeren.

Uit bovenstaande informatie kan dus besloten worden dat het SNP op rs37369 in het AGXT2-gen, voor een verhoogde BAIBA-uitscheiding kan zorgen door een deficiënte werking van het AGXT2-enzym. Bij hyper-BAIBA-trait patiënten is de BAIBA-uitscheiding veel hoger door het homozygoot genotype van twee recessieve thymineallelen.

Naast het feit dat hyper-BAIBA-trait kan voortkomen uit een SNP in het AGXT2-gen wordt een verhoogde BAIBA-uitscheiding in de literatuur echter ook vaak gerelateerd aan bepaalde ziektes (Fumitake et al., 1976; Enkhjargal en Tserennadmid, 2004; Borek et al., 1986). De verhoogde weefselaafbraak, celdestructie en DNA-afbraak die plaatsvinden tijdens de ziektes, zouden namelijk voor een verhoogde thymineconcentratie zorgen. Zoals hierboven reeds vermeld, wordt thymine afgebroken tot BAIBA, waardoor de ziektes op die manier tot een verhoogde BAIBA-concentratie zouden kunnen leiden (Armstrong et al., 1963). In een meer recent onderzoek van Kittel et al. (2014) werd echter aangetoond dat een SNP in het AGXT2-gen naast verhoogde BAIBA-concentraties ook tot verhoogde SDMA-concentraties leidt. SDMA staat voor symmetrisch dimethylarginine en is gelinkt aan cardiovasculaire ziektes en nierfalen. Waardoor er enige evidentie voor bestaat dat SNP's op het AGXT2-gen tot verergerde ziektebeelden kunnen leiden en dat het niet de ziekte is die voor een verhoogde BAIBA-uitscheiding zorgt, maar opnieuw de polymorfismes.

Allelenfrequentie op rs37369 geeft hoeveelheid SNP aan op globaal vlak en per gebied

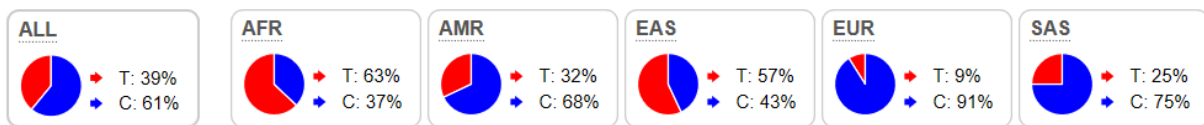


Fig. 5. Aanwezigheid van T-allel (thymine) geeft SNP op rs37369 aan. De allelenfrequentie wordt Globaal (ALL) en per gebied (AFR: Afrika; AMR: Amerika; EAS: Oost-Azië; EUR: Europa; SAS: Zuid-Azië) weergegeven en geeft een indicatie van de mate waarin het AGXT2-enzym werkt en BAIBA wordt uitgescheiden (uit www.ensembl.org).

1.2.5. Functies

BAIBA werd vroeger als een afbraakproduct gezien met daarnaast geen verdere functie in het lichaam. Het is pas in de laatste 10 jaar dat de werking van BAIBA effectief erkend wordt. Hieronder worden de voornaamste functies van BAIBA besproken, namelijk: het bruinen van wit vetweefsel en het bevorderen van de hepatische β -oxidatie. Meer specifiek wordt besproken wat de functies inhouden, hoe BAIBA die functies bekomt en wat de invloed hiervan is op metabole aandoeningen. Let wel op, er wordt hierbij geen onderscheid gemaakt tussen S- en R-BAIBA omdat hier nog niet voldoende onderzoek naar is gedaan. Het kan dus zijn dat S- en R-BAIBA elk hun eigen functies hebben, dat slechts één van de isomeren alle functies uitoefent of dat beide isomeren dezelfde functies hebben.

1.2.5.1. Bruinen van wit vetweefsel

Er bestaan 2 soorten vetweefsel: wit vetweefsel en bruin vetweefsel. Beide zijn metabole organen die instaan voor de energiebalans in het lichaam en het metabolisme van vet. Daarbinnen hebben ze echter wel een verschillende functie. Wit vetweefsel zorgt voornamelijk voor de opslag en mobilisatie van energie in de vorm van triglyceriden. Bruin vetweefsel daarentegen houdt zich voornamelijk bezig met het omzetten van energie in warmte en bevordert zo de thermogenese. Dit verschil in functie ontstaat voornamelijk door de hoeveelheid aanwezige mitochondriën in de organen. De mitochondriale werking zorgt ervoor dat suikers, vetten en eiwitten verbrand worden en dat daardoor energie vrijkomt. Die energie kan dan gebruikt worden door de vetweefsels om processen zoals lipolyse, β -oxidatie en warmteproductie te onderhouden. Bij bruin vetweefsel zijn er heel veel mitochondriën aanwezig en worden die processen aldus meer gestimuleerd dan bij het wit vetweefsel waar weinig mitochondriën aanwezig zijn (Park et al., 2014).

Naast het bruin en wit vetweefsel bestaat er echter nog een derde soort, 'beige' vetweefsel, dat ontstaat na het bruinen van wit vetweefsel. Dit houdt in dat er een verhoogde expressie van bruine vet-specifieke genen plaatsvindt in wit vetweefsel, waardoor meer mitochondriën gevormd worden in het wit vetweefsel en de functie naar een meer energie verbruikend bruin-vetweefsel verandert (Park et al., 2014). Dit houdt op zich een positieve verandering in doordat de energie meer verbruikt wordt en minder wordt opgeslagen en waardoor er aldus een kleinere kans is op het ontwikkelen van metabole ziektes.

Invloed van BAIBA op het bruinen van wit vetweefsel

BAIBA kan aanleiding geven tot het bruinen van wit vetweefsel, waardoor beige vetweefsel ontstaat. Roberts et al. (2014) vonden in hun onderzoek dat BAIBA de Peroxisome Proliferator-activated receptor α (PPAR α) expressie verhoogt in wit vetweefsel van muizen, zowel in vivo als in vitro. PPAR α , die een belangrijke transcriptiefactor is, stimuleert op zijn beurt genen die betrokken zijn bij het bruiningsproces (Boström et al., 2014). Onder die bruine vet-specifieke genen vallen onder andere het uncoupling protein 1 (UCP1) en de cell death-inducing DFFA-like effector a (CIDEA) (Cao et al., 2011), waarvan Roberts et al. (2014) eveneens bewezen dat ze door BAIBA worden vrijgezet (fig. 6), echter enkel wanneer er PPAR α aanwezig was in de muizen. Hieruit kon besloten worden dat BAIBA het bruinen van wit vetweefsel bevordert via een PPAR α -afhankelijke weg bij muizen.

In vitro onderzoek op menselijke cellen waarbij de invloed van BAIBA op de werking van het vetweefsel werd onderzocht, leverde volgende resultaten op. Wit vetweefsel kreeg een meer oxidatief fenotype na toediening van BAIBA. De basale zuurstofconsumptiesnelheid was hoger en de respiratoire capaciteit was gestegen. Verder was er een stijging in basale en door insuline gestimuleerde glucoseopname, waaruit blijkt dat BAIBA aanzet tot bruinen van wit vetweefsel door de activiteit van de mitochondriën te laten toenemen (fig. 7) (Roberts et al., 2014).

Hierna werd hetzelfde onderzocht maar in vivo, waarbij muizen twee weken lang met 100mg/kg/dag BAIBA behandeld werden. Hierbij werd een daling in vetmassa waargenomen en een stijging in glucosetolerantie, zuurstofverbruik en algemeen energieverbruik van het lichaam, wat opnieuw wijst op een stijging in mitochondriale activiteit en/of toename van de mitochondriën, door de bruining van wit vetweefsel (fig. 8) (Roberts et al., 2014).

BAIBA kan naast de PPAR α -afhankelijke weg mogelijks ook via een leptine-afhankelijke weg voor bruining van wit vetweefsel zorgen. De in vitro studie van Begriche et al. (2010) heeft namelijk aangetoond dat BAIBA voor een verhoogde productie van leptine kan zorgen in het wit vetweefsel van muizen. Hoe dit precies gebeurt, is echter nog niet geweten. Er werden wel speculaties geformuleerd in de review van Begriche et al. (2010). Over de werking van leptine zelf is wel veel geweten. Leptine kan de oxidatie van vrije vetzuren bevorderen via directe acties of via activatie van het neurale zenuwstelsel (Wang et al., 1999; Bjorbaek en Kahn, 2004). Een voorbeeld hiervan is via stimulatie van het UCP1, dat vrije vetzuren gebruikt voor de omzetting van energie naar warmte, waardoor thermogenese en vetzuuroxidatie aldus bevorderd worden (Commings et al., 2001). Leptine kan ook de aanmaak van nieuwe vetzuren verhinderen door de expressie van verscheidene lipogenische enzymen te onderdrukken (Nogalska et al., 2005). Er is dus enige evidentie dat BAIBA naast de PPAR α -afhankelijke weg, eveneens via een leptine-afhankelijke weg tot het bruinen van wit vetweefsel kan leiden.

BAIBA beïnvloedt dus met andere woorden het bruinen van wit vetweefsel, via PPAR α of via leptine, waarbij beige vetweefsel ontstaat dat een hoger energieverbruik heeft door een hogere activiteit van de mitochondriën. Aangezien dit vetweefsel voor een hogere verbranding zorgt dan wit vetweefsel, zal de invloed van BAIBA op het metabolisme positief zijn. Of dit voor beide enantiomeren van BAIBA geldt, werd niet onderzocht en er kan dus niet met zekerheid gezegd worden dat zowel R- als S-BAIBA een metabool effect uitoefent.

Invloed van BAIBA op bruine vet-specifieke genen

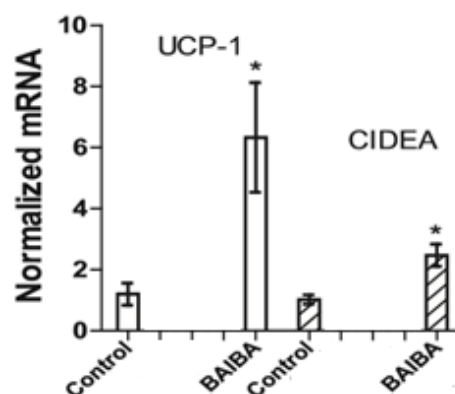


Fig. 6. BAIBA (5 μ M) verhoogt de concentratie van bruine vet-specifieke genen, meer bepaald van uncoupling protein-1 (UCP-1) en cell death-inducing DFFA-like effector a (CIDEA), via een in vitro test op vetweefsel (naar Roberts et al., 2014).

In vitro invloed van BAIBA op de werking van vetweefsel bij mensen

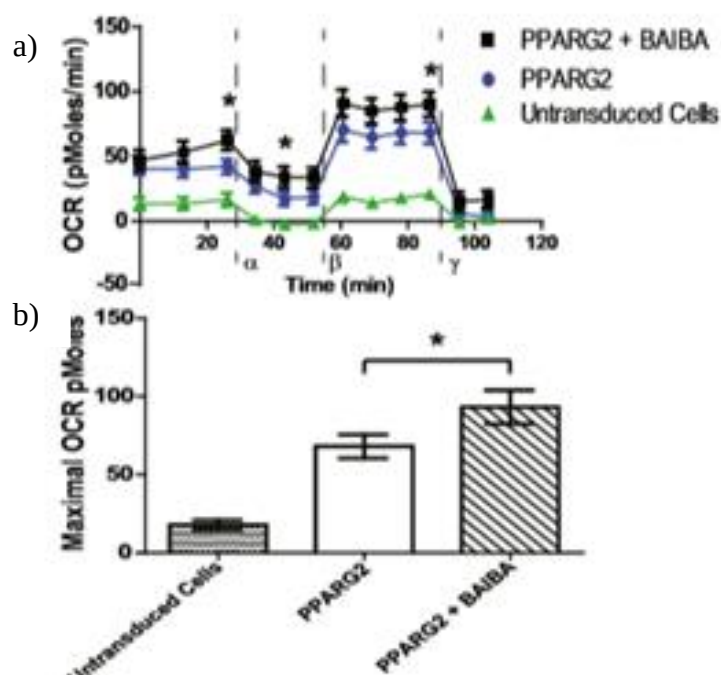


Fig. 7. BAIBA in peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (PPARG2) geprogrammeerde cellen zorgt voor a) een hogere zuurstofconsumptiesnelheid VO_2 (OCR) en b) een hogere VO_2 max (Maximal OCR) dan in PPARG2-geprogrammeerde cellen zonder BAIBA en dan ongeprogrammeerde cellen (uit Roberts et al., 2014).

In vivo invloed van BAIBA op de werking van vetweefsel bij muizen

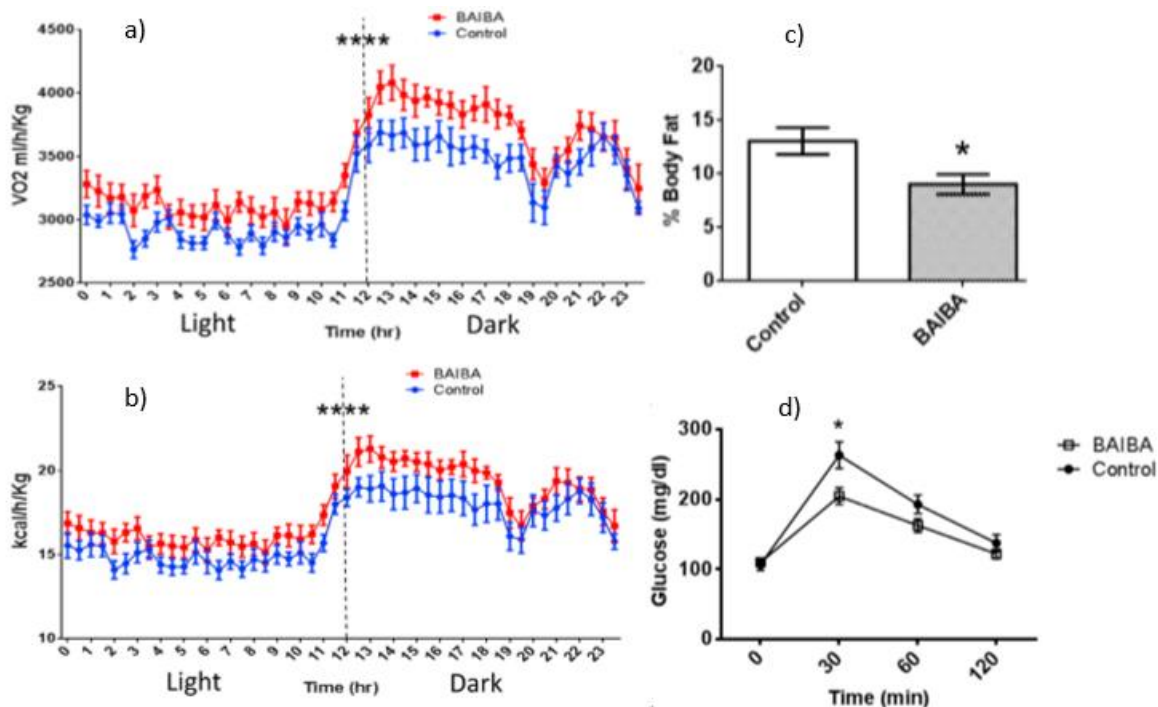


Fig. 8. BAIBA (100mg/kg/dag) zorgt voor: c) een daling in vetmassa en een stijging in: a) de zuurstofconsumptiesnelheid (VO_2), b) het energieverbruik en d) de glucosetolerantie (uit Roberts et al., 2014).

1.2.5.2. Hepatische β -oxidatie

Naast het bruinen van wit vetweefsel is er ook nog de hepatische β -oxidatie die één van de voornaamste functies van BAIBA vormt. Hepatische β -oxidatie is het proces waarin vetzuren worden afgebroken in de mitochondriën van de lever. Voorafgaand aan de β -oxidatie zullen opgeslagen triglyceriden vrijgesteld worden in de vorm van vrije vetzuren. De triglyceriden ondergaan lipolyse waarbij de vrije vetzuren losgemaakt worden van het glycerol (Stryer, 1995). De vrije vetzuurketens komen nu terecht in de bloedbaan en worden getransporteerd naar verschillende cellen door transporteiwitten (Houten en Wanders, 2010). De leverspecifieke vetzuurbindende proteïnes brengen de vetzuren logischerwijze naar de levercellen (Erol et al., 2004). Om de levercellen binnen te gaan is vetzuur transport eiwit 1 vereist. Eenmaal de cel binnen, worden de vrije vetzuren via acyl-CoA synthetases geactiveerd tot acyl-CoA (Eaton, 2002).

Nu vindt de laatste voorbereidende stap plaats, die in principe al tot de β -oxidatie gerekend kan worden. Het betreft het transport van acyl-CoA uit het cytosol naar de binnenkant van het mitochondrion. Dit gebeurt aan de hand van carnitinepalmitoyltransferase 1 (Bartlett en Eaton, 2004). Hierna vindt de eigenlijke β -oxidatie plaats, waarbij acyl-CoA afgebroken wordt tot acetyl-CoA. Dit is een cyclisch proces, waarbij acyl-CoA telkens korter wordt en er telkens een acetyl-CoA aangemaakt wordt. Acetyl-CoA kan uiteindelijk de citroenzuurcyclus ingaan en energie opleveren (Houten en Wanders, 2010).

Invloed van BAIBA op de hepatische β -oxidatie

In de studie van Note et al. in 2003 werd reeds bewezen dat BAIBA de β -oxidatie kan bevorderen. Dit werd aangetoond aan de hand van verhoogde concentraties van ketonen, acetoacetaat en β -hydroxybutyraat, na het toedienen van BAIBA in vivo bij muizen. De ketonen zijn namelijk een afbraakproduct van lange vetzuurketens. Ook in vitro testen in levercellen leverden een toename in vrijevetzuuroxidatie op na toediening van BAIBA (Roberts et al., 2014). Dit werd gemeten aan de hand van specifieke β -oxidatiegenen. Zo was er een verhoging in genexpressie van carnitinepalmitoyltransferase 1. Dit enzym dat zich op het buitenmembraan van de mitochondriën bevindt, reguleert de toegang van lange vetzuren en dus indirect de β -oxidatie ervan (Fromenty en Pessayre, 1995). Ook de genexpressie van de enzymen die instaan voor de eigenlijke β -oxidatie, zoals acyl-CoA oxidase 1, acyl-CoA dehydrogenases en fatty acid binding protein 3, was significant toegenomen (fig. 9) (Roberts et al., 2014; Jung et al., 2015).

De β -oxidatie gebeurt eveneens via een PPAR α -afhankelijke weg. Gulick et al. (1994) hadden reeds aangetoond dat PPAR α het transport, de opname en het katabolisme van vrije vetzuren kan regelen (Berger en Moller, 2002). Roberts et al. (2014) bewezen nadien dat BAIBA enkel een invloed heeft op de hepatische β -oxidatie indien PPAR α aanwezig is in de levercellen, waaruit besloten kon worden dat BAIBA gebruik maakt van PPAR α als mediërende factor voor de stimulatie van hepatische oxidatieve genen en aldus de hepatische β -oxidatie.

Invloed van BAIBA op de werking van de levercellen bij muizen

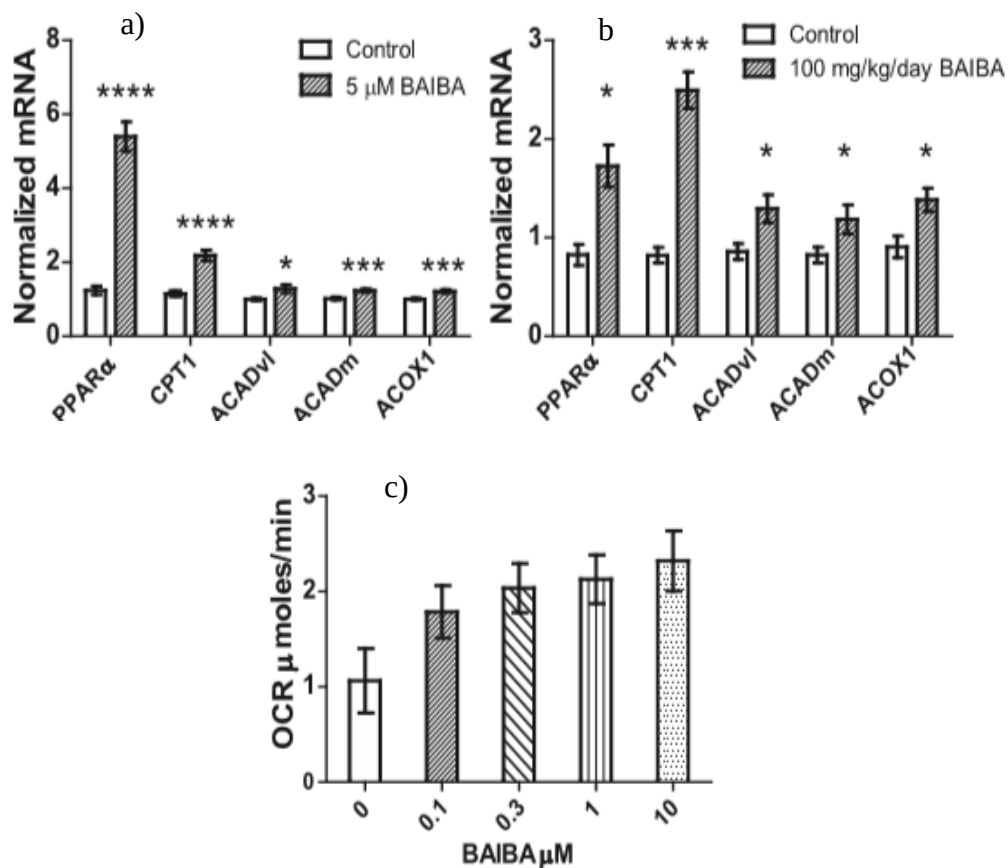


Fig. 9. BAIBA bevordert de hepatische β -oxidatie: a) bij in vitro behandelde levercellen met 5 μ M BAIBA gedurende 6 dagen en b) in vivo behandelde muizen met 100mg/kg BAIBA /dag gedurende 14 dagen. Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1), very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (ACADvl), medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (ACADm) en acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) zijn de β -oxidatiegenen die gestegen zijn na de toediening en Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR α) steeg ook. C) BAIBA verhoogt de VO₂ (OCR) in de levercellen (uit Roberts et al., 2014).

1.2.5.3. Impact van bovenstaande functies op metabole problemen

BAIBA zorgt voor het bruinen van wit vetweefsel en de hepatische β -oxidatie, wat inhoudt dat de glucosetolerantie, de vetoxidatie en glucoseverbranding stijgen, het algemeen energieverbruik toeneemt en de vetmassa bijgevolg afneemt. Verder wordt de aanmaak van nieuwe vetzuren eveneens voorkomen. Deze functies oefenen een grote invloed uit op het metabolisme en kunnen aldus metabole problemen tegengaan. Opnieuw dient hierbij vermeld te worden dat er geen onderscheid gemaakt werd tussen S- en R-BAIBA bij de functies, waardoor de invloed op het metabolisme door zowel S- als R-BAIBA bekomen kan worden ofwel door slechts één van de enantiomeren.

De verhoogde glucosetolerantie en vetzuuroxidatie kunnen onder andere insulineresistentie tegengaan. Insulineresistentie kan door verschillende factoren ontstaan. Eén daarvan is een verhoogd vettenaantal in het lichaam. De vrije vetzuren remmen namelijk de door insuline gestimuleerde glucoseopname, glycogeen synthese en glycogenolyse (Boden, 2003), bijgevolg ontstaan mogelijks metabole problemen. Aangezien BAIBA de vrijevetzurenoxidatie verhoogt, kan dit met andere woorden voor een daling in het aantal vrije vetzuren zorgen. Die daling in vet leidt uiteindelijk tot een verhoogde insulinesensitiviteit en een verminderde insulineresistentie. In de studie van Jung et al. (2015) werd dit bevestigd door een duidelijke daling in insulineresistentie na toevoeging van BAIBA in vivo bij muizen. Aangezien insulineresistentie een voorloper is op het ontwikkelen van diabetes type 2, kan BAIBA een rol spelen in de preventie en de behandeling van de aandoening. Hetzelfde geldt voor obesitas, aangezien de hoge vetmassa die tot gezondheidsproblemen kan leiden, door BAIBA verminderd kan worden (Shi et al., 2016).

Naast de verhoogde vetzuuroxidatie, kan een vermindering van pro-inflammatoire cytokines eveneens een daling in insulineresistentie opleveren. BAIBA kan via een verhoogde productie van AMP-geactiveerd proteïne kinase de expressie van de pro-inflammatoire cytokines verhinderen. Op die manier kan BAIBA dus zowel via PPAR α , leptine als via AMPK voor een daling in insulineresistentie zorgen (Khodabandehloo et al., 2016 ; Jung et al., 2015).

1.3. INVLOED VAN FYSIEKE ACTIVITEIT OP BAIBA

Fysieke activiteit kan als interventie gebruikt worden om obesitas en type 2 diabetes te behandelen of om preventief te werk te gaan. De rol van de skeletspieren hierin werd slechts recentelijk erkend. In 2008 hebben Pedersen en Febbraio namelijk aangetoond dat skeletspieren endocriene organen zijn. Dit houdt in dat ze bij activatie cytokines en proteïnen produceren en vrijzetten. Aangezien de cytokines en proteïnen uit myocyten worden vrijgezet worden ze ook wel myokines genoemd. Die myokines kunnen een endocrien, paracrien of autocrien effect uitoefenen en aldus het metabolisme beïnvloeden in eigen weefsel of andere weefsels en organen. Activatie van skeletspieren en aldus fysieke activiteit in het algemeen kunnen het metabolisme verbeteren en metabole ziektes tegengaan of behandelen.

De myokines spelen hierin dus een belangrijke rol, waardoor Roberts et al. (2014) op zoek gingen naar de verschillende myokines die vrijkomen bij fysieke activiteit. Hierbij ontdekten ze dat BAIBA mogelijks één van die kleine myokines is.

1.3.1. BAIBA als myokine

Fysieke activiteit houdt in dat de spieren contraheren. Die spiercontracties lokken een verhoogde expressie van PGC-1 α uit in de spiercellen. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α is een transcriptionele co-activator. Dit wil zeggen dat PGC-1 α bindt op nucleaire receptoren en andere transcriptiefactoren en zo de expressie van bepaalde genen beïnvloedt (Puigserver et al., 1999), om uiteindelijk het energiemetabolisme in het lichaam te reguleren (Liang en Ward, 2006). Roberts et al. (2014) hebben aangetoond dat spiercellen met een overexpressie van PGC-1 α in vitro tot de productie van BAIBA leiden. Aangezien BAIBA vrijkomt door PGC-1 α , die op zijn beurt vrijkomt door spieractivatie, kon gesteld worden dat BAIBA geproduceerd wordt onder invloed van spiercontracties. Daarenboven oefent BAIBA een endocrien effect uit op andere weefsels en organen, waardoor in het onderzoek van Roberts et al. (2014) besloten werd dat BAIBA een myokine is, hoewel de molecule op zich niet op een cytokine of een proteïne lijkt (Schnyder en Handschin, 2015).

1.3.1.1. Fysieke activiteit die tot een verhoging in BAIBA-concentratie leidt

In de studie van Roberts et al. (2014) werd voor het eerst onderzoek gedaan naar het effect van fysieke activiteit op de concentratie van BAIBA in het plasma. De eerste metingen vonden plaats bij muizen na een drie weken lange interventie, waarbij de experimentele groep vrij mocht rondlopen in een rad en de controlegroep sedentair was. Er werd een vergelijking gemaakt tussen de pre- en postwaarden, waaruit bleek dat de BAIBA-concentratie met 19% gestegen was in het plasma van de experimentele groep. De tweede metingen werden uitgevoerd bij mensen, die 20 weken lang een fysieke interventie volgden, waarbij drie keer per week een duurtraining gedaan werd op een fietsergometer. Er werd gestart met een intensiteit van 55% van de VO_{2max} en een duur van 30 minuten per training, waarna geleidelijk aan werd overgegaan naar 75% van de VO_{2max} en een duur van 50 minuten per training. Die laatste genoemde conditie hielden ze de laatste 6 weken van de interventie aan. Na de interventie werd een stijging van 17% gevonden in de BAIBA-concentratie in het plasma. Hieruit kan besloten worden dat chronische aerobe fysieke activiteit leidt tot een stijging in BAIBA-concentratie in het plasma. In een recente studie van Morales et al. (2017) werd geen stijging in BAIBA-concentratie vastgesteld na een acute fysieke inspanning aan een intensiteit van 70% VO_{2max} waarbij 350 kcal verbrand werden. In bovenstaande onderzoeken werd geen onderscheid gemaakt tussen R- en S-BAIBA, waardoor niet kan worden aangetoond welke van de isomeren vrijkomt na een chronische fysieke inspanning en welke al dan niet na een acute fysieke inspanning. Hieronder wordt besproken welke isomeer indirect geproduceerd zou kunnen worden onder invloed van fysieke prikkels en op welke manier.

1.3.1.2. S-BAIBA als myokine?

Fysieke inspanningen kunnen tot de afbraak van BCAA's leiden (branched-chain amino acids), waartoe valine behoort (Harper et al., 1984; Shimomura et al., 2006) en zoals reeds aangehaald, kan uit het katabolisme van valine S-BAIBA voortkomen. Indirect zou een fysieke inspanning aldus tot de productie van S-BAIBA kunnen leiden. Leskinen et al. (2010) toonden namelijk aan dat chronische fysieke prikkels tot een stijging in de expressie van de genen kan leiden die instaan voor enzymen uit de valinedegradatieweg. Dit werd ook door Roberts et al. (2014) aangetoond door gebruik te maken van spiercellen met een over-expressie van PGC-1 α . De stijging in genexpressie leidde tot een stijging in enzymen die instaan voor de katalyse van valine, waaruit S-BAIBA gevormd wordt. De in vivo studies stellen dat chronische aerobe fysieke inspanningen een effect kunnen hebben op BCAA-afbraak en dit zou indirect de S-BAIBA-productie kunnen bevorderen. Daarbovenop zou het effect van de aerobe activiteit op

de BCAA-afbraak groter zijn bij getrainde personen (Shimomura et al., 2004). Of een acute fysieke inspanning een invloed heeft op de BCAA-afbraak werd nagegaan in de studie van Wagenmakers et al. (1991) waarbij een inspanning van 2 uur en een half aan een intensiteit van 70-75% W_{max} geen verhoogde BCAA-afbraak opleverde. De inspanningen werden uitgevoerd door hoog getrainde personen waardoor deze inspanningen voornamelijk aeroob verliepen. In het onderzoek leverde diezelfde acute fysieke inspanning met glycogendepletie wel een stijging in BCAA-afbraak op, waardoor de hypothese gesteld kan worden dat S-BAIBA zal stijgen na een hoog intensieve acute fysieke inspanning omdat de depletie van glycogeen dan hoger ligt (Vøllestad en Blom, 1985).

1.3.1.3. R-BAIBA als myokine?

Fysieke activiteit kan echter ook zorgen voor de afbraak van DNA (Davison G.W., 2016) en meer specifiek voor de afbraak van pyrimidines (Briviba et al., 2005; Wagner et al., 2010; Tsai et al., 2001) (fig. 10). In de studies die hierboven worden aangegeven, worden aerobe fysieke inspanningen geleverd tegen hoge intensiteit waarbij heel wat ATP (adenosinetrifosfaat) geconsumeerd wordt en waardoor UDP en UMP (uracilmonofosfaat en -difosfaat) opstapelen, die op hun beurt de oxidatie van pyrimidines bevorderen (Dudzinska et al., 2010). Hetzelfde werd gevonden bij een aerobe inspanning van 25 minuten aan 65% VO_2max (Yamamoto et al., 2010). Thymine behoort tot een van de pyrimidines en zoals reeds aangehaald kan de afbraak van thymine tot R-BAIBA leiden. Aerobe fysieke inspanningen zouden dus bijgevolg indirect tot een stijging in R-BAIBA kunnen leiden. Welke inspanningen naast aerobe fysieke inspanningen voor DNA-afbraak en pyrimidine oxidatie kunnen zorgen is onvoldoende onderzocht geweest.

Als laatste werd ook een stijging gevonden in de expressie van het AGXT2-enzym bij in vitro overexpressie van PGC-1 α in spiercellen. Het enzym verzorgt de afbraak van R-BAIBA naar R-MMSA waardoor een stijging in het enzym zou kunnen wijzen op de nood voor een verhoogde R-BAIBA afbraak na een inspanning, door de stijging in R-BAIBA (Roberts et al., 2014).

Afbraak van DNA en oxidatie van pyrimidines na zware aerobe fysieke inspanning

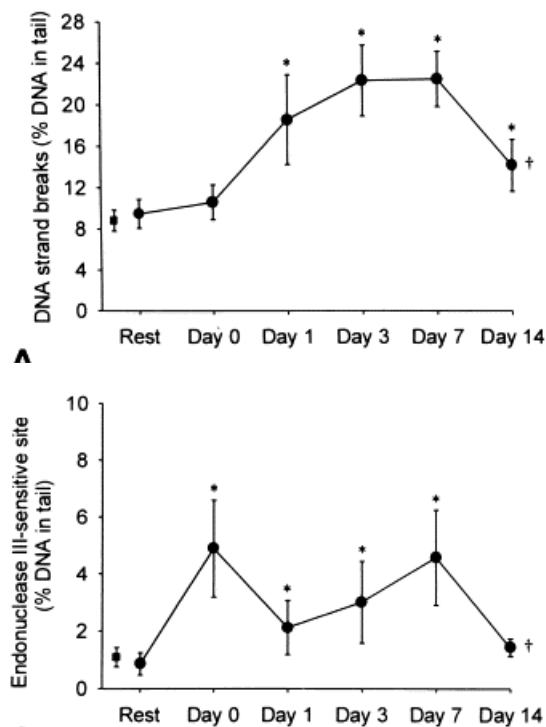


Fig. 10. Hoeveelheid DNA-afbraak en indicatie van pyrimidine-afbraak aan de hand van endonuclease 3 gevoelige plaatsen voor en na een fysieke inspanning (42km lopen, getrainde personen) (uit Tsai K. et al., 2001).

Verdere evidentie voor de link tussen fysieke activiteit en BAIBA-productie is te vinden in de associatie van fysieke inactiviteit met een lage BAIBA-concentratie (Molfino et al., 2017). In de studie van Rietman et al. (2016) werd aansluitend aangetoond dat obese mensen een hogere BCAA-concentratie en een lagere BAIBA-concentratie hebben in vergelijking met mensen met een gezond BMI. Daarnaast was ook de expressie van de taurinetransporter gestegen na een fysieke inspanning, die kan instaan voor het transport van BAIBA doorheen het apicale membraan van epitheelcellen van de nier e.a. naar het plasma toe (Roberts et al., 2014). Indirect zou dit kunnen wijzen op een verhoogde concentratie aan BAIBA, vrijgesteld door de fysieke inspanning. Of dit over R-BAIBA gaat of S-BAIBA is niet te vinden in de literatuur.

Fysieke activiteit kan met andere woorden via PGC-1 α -productie in de spiercellen of via een andere weg de productie van BAIBA bevorderen (Roberts et al., 2014). Welke vorm van BAIBA hiermee geproduceerd wordt is nog niet aangetoond, maar er is wel voor beide enantiomeren enige evidentie gevonden dat ze kunnen worden vrijgesteld na een fysieke inspanning. In het geval van S-BAIBA worden de genen die instaan voor het valinekatabolisme geactiveerd tijdens een inspanning, waardoor enzymen gevormd worden die valine afbreken en

op die manier mogelijks S-BAIBA vormen (Roberts et al., 2014). In het geval van R-BAIBA wordt de DNA-afbraak en de oxidatie van pyrimidines, waaronder thymine, bevorderd door inspanning waardoor mogelijks R-BAIBA geproduceerd wordt (Davison G.W., 2016). Hypothetisch kan gesteld worden dat fysieke inspanningen de aanmaak van zowel R- als S-BAIBA verhogen.

1.4. PROBLEEMSTELLING

Er is nog maar één studie die heeft aangetoond dat BAIBA een myokine kan zijn. De theorie, de in vitro testen en de in vivo testen leveren hiervoor bewijs doch er is nog onzekerheid. In het onderzoek werden interventies gebruikt van enerzijds 3 weken bij muizen en anderzijds 20 weken bij mensen, waarbij de invloed van chronische fysieke activiteit werd gemeten. Het acuut effect van een fysieke inspanning werd niet onderzocht, waardoor niet met zekerheid gezegd kan worden dat BAIBA een myokine is. Er is aldus nood aan een in vivo test die bewijs levert dat een acute fysieke inspanning de molecule BAIBA vrijzet.

In de studie van Roberts et al. (2014) werd ook geen onderscheid gemaakt tussen de twee enantiomeren van BAIBA, namelijk S- en R-BAIBA, waardoor nog niet geweten is of beide enantiomeren worden aangemaakt onder invloed van chronische fysieke inspanningen of slechts één ervan. Dit is van belang omdat ze wel een verschillend metabolisme hebben.

Ook welke trainingsconditie de beste resultaten kan opleveren qua BAIBA-productie en de uitoefening van de functies ervan, is nog niet geweten. Testen met verschillende trainingscondities konden hiervoor een oplossing bieden. Dit kan van belang zijn bij het opstellen van goede fysieke interventies ter preventie of behandeling van metabole aandoeningen.

Als laatste werd ook geen onderscheid gemaakt tussen mensen met hyper-BAIBA-trait en mensen zonder een enkelvoudig nucleotide polymorfisme in het AGXT2-gen. Aangezien de werking van het AGXT2-enzym aangetast wordt door een SNP, verwachten we dat de afbraak van R-BAIBA verschillend zal zijn bij de twee groepen. Dit kan mogelijk een verschillende BAIBA-concentratie opleveren in het plasma na een fysieke inspanning, wat de metabole functies zou kunnen beïnvloeden.

1.5. ONDERZOEKSVRAGEN

Op basis van de probleemstellingen die hierboven geformuleerd werden, zijn er 3 onderzoeksvragen opgesteld.

1.5.1. Eerste onderzoeksvraag

Wat is het effect van een acute fysieke inspanning op de BAIBA-concentratie in de circulatie? De hypothese die hierbij gesteld wordt is dat de acute inspanning voor een stijging in BAIBA-concentratie zal zorgen. Waarmee we hopen te bevestigen dat BAIBA effectief een myokine is.

1.5.2. Tweede onderzoeksvraag

Is er een verschillend verloop van R-BAIBA- en S-BAIBA-concentratie onder invloed van een acute fysieke inspanning?

De hypothese hierbij is dat zowel S- als R-BAIBA zullen toenemen na de acute fysieke inspanning. Er werd namelijk enerzijds evidentie gevonden voor de afbraak van valine onder invloed van fysieke inspanningen waardoor S-BAIBA zou stijgen en anderzijds toonde de studie van Tsai et al. (2001) aan dat fysieke inspanningen kunnen leiden tot de afbraak van DNA met als gevolg de aanmaak van R-BAIBA. Hiermee hopen we aan te tonen dat beide enantiomeren van BAIBA als een myokine fungeren.

1.5.3. Derde onderzoeksvraag

Heeft een enkelvoudig nucleotide polymorfisme in het AGXT2-gen, meer bepaald op rs37369, een invloed op de R- en/of S-BAIBA-concentratie na een fysieke inspanning?

De hypothese hierbij is dat de concentratie van S-BAIBA in het plasma evenveel zal stijgen na een acute fysieke inspanning bij mensen met de SNP als zonder de SNP, maar dat de R-BAIBA-concentratie meer zal toenemen bij de proefpersonen met de SNP in vergelijking met de proefpersonen zonder de SNP. Verder wordt verwacht dat de proefpersonen die de SNP hebben meer R-BAIBA en evenveel S-BAIBA in de urine zullen krijgen na de inspanning ten opzichte van de andere proefpersonen zonder de SNP.

2. Methode

In de methode worden het studiedesign, de procedure, de meetinstrumenten en de data-analyse besproken.

2.1. STUDIEDESIGN

Er werd een experimenteel gerandomiseerd cross-over onderzoek uitgevoerd dat bestond uit 2 fases. In de eerste fase werden de proefpersonen gerekruteerd en werd een screening gedaan en op basis daarvan werden een aantal proefpersonen gekozen die voldeden aan de criteria voor het onderzoek. De proefpersonen die hier uit kwamen, namen deel aan fase 2, de testdagen.

2.1.1. Fase 1: screening

De 44 proefpersonen kwamen nuchter naar de screening, dit wil zeggen dat ze de voorbije 8 uur niets gegeten of gedronken mochten hebben (met uitzondering van water). Het DNA van de proefpersonen werd geanalyseerd en op basis van de genotypes werden 15 proefpersonen geselecteerd om deel te nemen aan de testdagen.

2.1.1.1. Proefpersonen

Van de 15 proefpersonen die geselecteerd werden op basis van het genotype op rs37369 van het AGXT2-gen, werden er 7 homozygoten zonder een SNP (CC) gekozen, 5 heterozygoten met een SNP (CT) en 3 homozygoten (TT) met een dubbele SNP. Voor elke homozygoot (TT) werd een gematcht proefpersoon gezocht die heterozygoot (CT) was en één die homozygoot (CC) was. De proefgroep bestond verder uit 12 mannen en 3 vrouwen, waarvan de vrouwen elk een verschillend genotype hadden en de mannen eveneens verdeeld waren overheen de genotype-groepen (tabel 1).

Alle proefpersonen werden gebriefd over alle informatie betreffende het onderzoek. Iedere deelnemer tekende vooraf ook een informed consent, waarbij ze ervan op de hoogte gebracht werden dat deelname aan het onderzoek op eigen verzoek is en op ieder moment kon worden stopgezet. Deze studie werd tevens goedgekeurd door het Ethisch Comité van het UZ Gent.

	Kenmerken van de proefpersonen (Gem + SD)					
	Leeftijd (jaar)	Gewicht (kg)	Lengte (cm)	BMI (kg/cm ²)	Wmax (Watt)	VO ₂ max (ml/kg/min)
Totaal (n=15)	23,53 ± 3,38	74,57 ± 12,65	180,13 ± 7,45	22,87 ± 2,70	346,63 ± 73,80	50,15 ± 10,25
CC (n=7)	22,32 ± 1,08	74,74 ± 9,62	182,71 ± 6,58	22,31 ± 1,67	366,14 ± 66,13	51,9 ± 6,10
CT (n=5)	25,16 ± 5,46	71,28 ± 10,48	175,20 ± 8,08	23,14 ± 2,23	317,80 ± 93,41	48,72 ± 16,21
TT (n=3)	23,66 ± 2,28	79,67 ± 23,60	182,33 ± 6,03	23,71 ± 5,53	349,1667 ± 64,24	48,47 ± 8,81
Man (n=12)	23,69 ± 3,70	78,27 ± 11,30	181,83 ± 7,31	23,60 ± 2,46	374,46 ± 49,49	52,55 ± 9,70
Vrouw (n=3)	22,91 ± 1,95	59,80 ± 3,03	173,3 ± 2,75	19,92 ± 1,26	235,33 ± 37,69	40,57 ± 6,70

Tabel 1. Gegevens van de 15 proefpersonen aan de hand van gemiddelde en standaarddeviatie

2.1.2. Fase 2: testen

De 15 proefpersonen die geselecteerd waren namen deel aan fase 2 van het onderzoek, waarin 3 testdagen gepland werden en waarbij de dag voorafgaand aan de testdag niet intensief gesport mocht worden. Bij testdag 2 en 3 mocht noch vlees noch vis gegeten worden de dag voordien. Ook diende er op die testdagen op een sedentaire manier naar het labo gekomen te worden, dit wil zeggen met de auto of met het openbaar vervoer, niet met de fiets. Tijdens de testdagen was er ook telkens een arts aanwezig.

2.1.2.1. Testdag 1: maximale inspanningstest

De eerste testdag had als doel om het maximale wattage van de proefpersonen te bepalen en vond minimum één week voor de eigenlijke testdagen, 2 en 3, plaats. De proefpersonen gingen bij de arts voor een anamnese waarbij vastgesteld werd of ze mochten deelnemen aan de inspanningstest of niet. Het gewicht en de lengte werden gemeten en ingebracht in het toestel van de fietsergometer (Excalibur). Er werd gestart met een opwarming van 3 minuten tegen 50 W, waarna het wattage lineair steeg met 25W/min. De proefpersonen bleven tussen de 80

en de 100 rpm fietsen en werden hierbij aangemoedigd door de testafnemers. De test stopte wanneer de proefpersoon onder de 70 rpm ging en op dat moment werd het maximaal bereikte wattage neergeschreven.

2.1.2.2. Testdag 2: inspanning aan 40% W_{max}

De eigenlijke inspanningstest hield in dat 1 uur gefietst werd tegen 40% van het maximaal wattage, waarvan het percentage berekend werd op basis van het maximaal bereikte wattage tijdens de maximale inspanningstest op testdag 1 (fig. 5).

Bij aankomst werd een katheter gestoken en meteen een bloedstaal afgenomen (bloed in nuchtere toestand), alsook werd de blaas meteen geledigd. Hierna kregen de proefpersonen een gestandaardiseerd ontbijt aangeboden, dat bestond uit boterhammen, confituur, choco, kaas, fruitsap en/of water (op testdag 2 en 3 moest dezelfde hoeveelheid gegeten worden). 50 minuten later werd een urinestaal genomen en meteen daarna het tweede bloedstaal, ook wel bloedstaal pre genoemd, omdat het net voor de inspanningstest gebeurde. De proefpersoon startte nadien met de inspanningstest, die een uur duurde. Tijdens de test werden nog 2 bloedstalen afgenomen, één na 30 minuten en één op het einde van de test, na 60 minuten. 30 minuten na de inspanning werd nog een laatste bloedstaal afgenomen. Naast de bloedafnames werden eveneens urinestalen verzameld, 1 uur, 2 uur en een half en 4 uur na de inspanning, waarbij na de eerste urinelozing opnieuw een gestandaardiseerde maaltijd mocht gegeten worden.

2.1.2.3. Testdag 3: rustdag

Testdag 3 dient als controle en heeft bijgevolg hetzelfde verloop als testdag 2, maar zonder de fysieke inspanningstest. Testdag 2 en 3 werden wel gerandomiseerd uitgevoerd.

Testprotocol

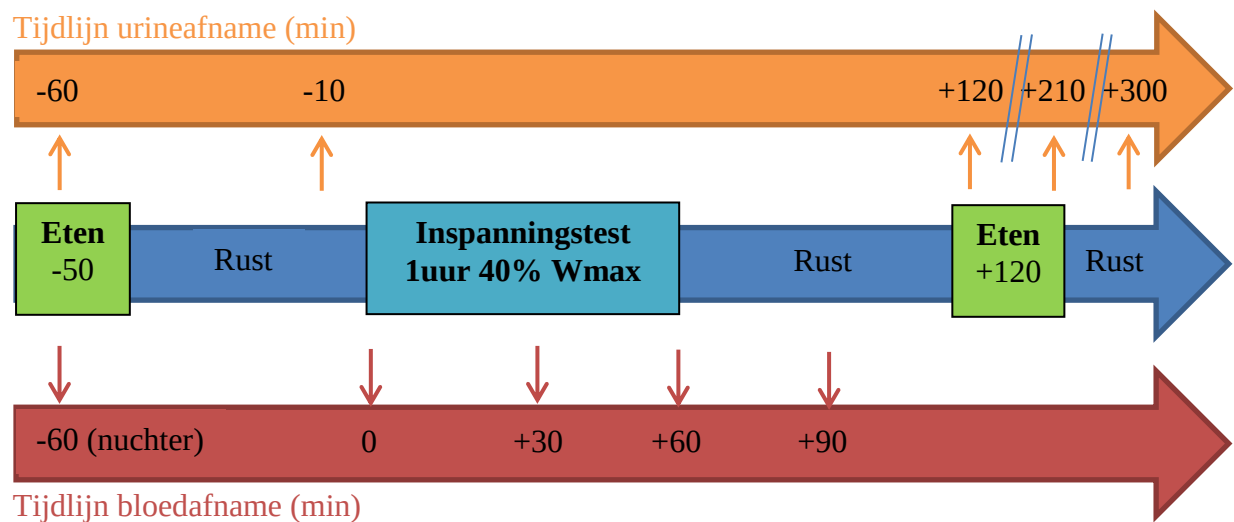


Fig. 11. Tijdstippen waarop de inspanningstest afgenomen werd, de bloedstalen en de urinestalen werden afgenomen en waarop gegeten werd.

2.2. PROCEDURE & MEETINSTRUMENTEN

2.2.1. DNA-analyse

Het DNA van de proefpersonen en meer specifiek het AGXT2-gen waarop de SNP kan voorkomen diende geanalyseerd te worden in functie van de screening. De procedure die hiervoor gevolgd werd, wordt hieronder besproken met aanvullend een woordje uitleg over de gebruikte meetinstrumenten.

Bij de bloedafname tijdens de screening moesten de proefpersonen nuchter zijn. Er werd per persoon 1 EDTA bloedstaal afgenomen van 4 ml, dat gecentrifugeerd werd tegen maximale snelheid voor 4,5 minuten en nadien tegen 12000 rpm voor 5 minuten. Aan de hand van de Qiagen DNA isolatie methode werd nadien het DNA geëxtraheerd uit de witte bloedcellen (zie bijlage 3) en werd de DNA-concentratie naar 25 ng/μl gebracht door te verdunnen met DNA hydration solution (Qiagen). Aan het DNA werd een mastermix toegevoegd, bestaande uit een primermix, een Tapmanmix en een sybr green oplossing. De primermix van 100 μM werd samengesteld uit 2 μL forward DNA-strain (CAT-TGG-AGG-GTG-GAA-GAA-GA), 2 μL reverse DNA-strain (CAG-AAA-GGT-GAA-TGC-AGT-GG) en 46 μL H₂O, waarvan 0,4 μL gebruikt werd per sample. Van de Tapmanmix werd 6 μL gebruikt en van de Sybr green oplossing 1,2 μL per sample. De mastermix van 7,6 μL werd uiteindelijk toegevoegd aan 0,5 μL DNA met een concentratie van 25 ng/μl. De eindoplossing met een concentratie van 0,2 μM en een volume van 8,1 μL werd in het PCR-apparaat ingebracht om het DNA te vermenigvuldigen (tabel 2). Na de vermenigvuldiging van DNA aan de hand van de polymerase kettingreactie (PCR) volgde de High resolution melting (HRM) om het genotype van de proefpersonen te bepalen. De werkwijze van zowel PCR als HRM staan hieronder verder beschreven, alsook de uitkomst van beide testen is in bijlage te vinden (bijlage 4).

2.2.1.1. PCR

PCR is de afkorting van polymerase chain reaction, of ook wel polymerase kettingreactie in het Nederlands en wordt gebruikt in het DNA-sequencing proces.

Het geëxtraheerd DNA uit het bloed wordt samen met de mastermix in het PCR-apparaat gestoken. De mastermix bestaat onder meer uit een DNA-primer, meer bepaald de primer nodig om een deel van het AGXT2-gen te vormen, enkelvoudige nucleotiden (adenine, guanine,

thymine en cytosine) en het enzym *Thermus aquaticus* polymerase. Eénmaal alles op punt staat, zal het apparaat een dertigtal keer hetzelfde proces dat uit 3 stappen bestaat, doorlopen (tabel 2). De eerste stap houdt het verwarmen van het DNA-monster tot 95°C in waarbij de dubbele strengen worden opgesplitst in enkelvoudige strengen. In de tweede stap wordt de temperatuur weer verlaagd, zodat DNA-primers zich aan de enkelvoudige DNA-strengen gaan binden. Als laatste stap zal het Tag-enzym de enkelvoudige nucleotiden toevoegen aan de primer, waardoor een complementaire DNA-streng gevormd wordt ten opzichte van de oorspronkelijke streng. Dit zal er voor zorgen dat er na enkele cycli allemaal dezelfde DNA-stukjes gevormd worden. Het DNA is nu voldoende vermenigvuldigd om het genotype te kunnen bepalen en dit gebeurt aan de hand van HRM.

	Cyclussen (aantal)	Target (°C)	Duur (sec)	Ramp rate (°C/s)
Pre-incubatie	1	95	180	4,8
Amplificatie	38	95	30	4,8
		58	30	2,5
		72	60	4,8
Melting curve	1	95	60	4,8
		40	60	2,5
		65	1	4,8
		90	Continue (25 metingen)	0,02
Cooling				

Tabel 2. PCR-protocol dat gebruikt werd in dit onderzoek

2.2.1.2. HRM

‘High resolution melting’ of HRM afgekort, is een detectiemethode voor onder andere polymorfismen in het DNA. De sybr green oplossing die aan het DNA werd toegevoegd, is een fluorescerende vloeistof die zich bindt aan de waterstofbruggen die de DNA strengen met elkaar verbinden. De fluorescentie die hierdoor ontstaat, wordt gedetecteerd door het HRM-toestel. Het protocol van de HRM houdt in dat het DNA geleidelijk aan wordt opgewarmd van 55°C tot 95°C, waardoor de dubbele strengen van elkaar gescheiden worden en waardoor steeds minder fluorescentie detecteerbaar is.

Het verloop van de fluorescentie wordt weergegeven in een curve en aan de hand van de curve kan bepaald worden of een polymorfisme al dan niet aanwezig is in het DNA. Indien er een polymorfisme aanwezig is, zal een verschuiving in de curve zichtbaar zijn of zal de curve een andere vorm aannemen. Bij homozygoten zal een verschuiving zichtbaar zijn en bij heterozygoten een gewijzigd verloop, op die manier wordt het mogelijk om in het onderzoek aan te tonen of de proefpersonen op beide allelen, op één allel of op geen enkel allel SNP rs37369 hebben (bijlage 4).

2.2.2. Bloedafname

Op de twee testdagen werd dezelfde procedure gevolgd en werd een katheter gestoken om gemakkelijk op vijf verschillende momenten bloedstalen af te nemen (fig. 5). Op elk moment werd één bloedstaal van 9 ml afgenomen in een bloedbuisje met heparine om bloedstolling te voorkomen. Het bloedstaal werd hierna gecentrifugeerd voor 5 minuten tegen maximale snelheid en nadien nog eens voor 5 minuten tegen 12000 rpm, om op die manier bloedplasma af te scheiden van de rest van het bloed. Hierna werd drie keer 1 ml plasma gepipetteerd in drie verschillende lege buisjes, die nadien meteen werden diepgevroren.

2.2.3. Urineafname

De urineafname gebeurde op de twee testdagen op dezelfde manier, namelijk bij alle proefpersonen op drie verschillende momenten, namelijk nuchter, net voor de inspanning en één uur na het beëindigen van de inspanning en werd uitgevoerd door de proefpersonen zelf (fig. 5). Bij slechts vijf proefpersonen werd ook op het tijdstip 2 uur 30 na de inspanning en 4 uur na de inspanning een urinestaal afgenomen. Deze data zullen als preliminair beschouwd worden. Bij elke urinelozing werd het volume bepaald door de onderzoekers en werden drie stalen van telkens 3 ml genomen, die nadien zo snel mogelijk diepgevroren werden.

2.2.4. Bloed en urineanalyse

De bloed- en urinestalen, met uitzondering van de nuchtere stalen, werden verder geanalyseerd door A. Van Kuilenburg in Nederland, de methode die hiervoor gebruikt werd is echter nog niet gepubliceerd en dus niet bekend. In een vorig en gepubliceerd onderzoek van A. Van Kuilenburg werd gebruik gemaakt van High Performance Liquid Chromatography om de BAIBA-moleculen te scheiden van het bloed- en urinemengsel en van gaschromatografie om S- en R-BAIBA van elkaar te scheiden (Van Kuilenburg et al., 2004). Hieronder worden deze meetinstrumenten besproken.

2.2.4.1. HPLC

HPLC is de afkorting van High Performance Liquid Chromatography en is een scheidingstechniek. Binnen deze studie werd hoogstwaarschijnlijk gebruik gemaakt van de reversed HPLC, waarbij het proces start met een polaire oplossing die door een hogedrukpomp wordt voortgestuwd naar een kolom met apolaire materie in. Aangezien de oplossing voortbeweegt, wordt het ook wel de mobiele fase genoemd. In die mobiele fase wordt dan het staal toegevoegd waarop de scheidingstechniek dient toegepast te worden. In dit onderzoek zijn het de bloedstalen en de urinestalen die toegevoegd worden. Samen met de polaire oplossing komt het staal aan bij de kolom en wordt het erdoor gestuwd. In de kolom zitten echter kleine bolletjes, meestal van silica materiaal omringd door lange koolstofketenen, die een apolair karakter hebben. Afhankelijk van de polariteit van de molecule uit het staal, zal die meer affiniteit vertonen met de apolaire materie uit de kolom of met de polaire oplossing. De moleculen die meer affiniteit vertonen met de polaire oplossing, zullen sneller vooruitgaan en de moleculen met een hogere affiniteit voor de apolaire materie in de kolom zullen trager voortbewegen, op die manier worden de verschillende moleculen van elkaar gescheiden en zullen ze op een verschillend tijdstip aan de detector passeren.

Om ervoor te zorgen dat ook de apolaire moleculen door de kolom geraken, wordt gebruik gemaakt van een polariteitsgradiënt in de oplossing. Dit wil zeggen dat er eerst een polaire oplossing gebruikt wordt van 90% zuiver water en 10% acetonitril en nadien geleidelijk aan wordt overgegaan naar een hoger percentage van acetonitril en aldus naar een apolaire oplossing.

De detectie gebeurt dan aan de hand van fluorescentiespectroscopie. Eerst zullen hiervoor derivaten worden toegevoegd aan de stalen, welke fluorescentie mogelijk maken. Daarna worden de moleculen bestraald met licht en absorberen ze hieruit fotonen. De energiestaat van de moleculen verhoogt hierdoor, maar daalt erna opnieuw wanneer de fotonen weer worden vrijgezet. Die vrijzetting van fotonen gaat aldus gepaard met energievrijgave in de vorm van fluorescentie. Deze fluorescentie wordt gedetecteerd en wordt in het computerprogramma weergegeven in de vorm van een chromatogram.

Er zullen aldus na de scheiding en de detectie verschillende pieken zichtbaar zijn in het computerprogramma. Elke verschillende molecule komt namelijk op een verschillend tijdstip aan de detector en kaatst een andere hoeveelheid licht terug. In deze studie zal BAIBA dus een bepaalde retentietijd hebben (tijd nodig om van injectieplaats tot aan de detector te geraken) en een bepaalde hoeveelheid licht terugkaatsen, waardoor het mogelijk wordt om BAIBA te scheiden van de andere moleculen en te kwantificeren.

2.2.4.2. Gaschromatografie

Met de HPLC-scheidingstechniek kan BAIBA uit het plasma gescheiden worden, waardoor kwantificatie hiervan mogelijk is. In het onderzoek dienen echter kwantitatieve gegevens bekomen worden van de enantiomeren van BAIBA, namelijk S- en R-BAIBA waarvoor de gaschromatografie gebruikt kan worden aangezien die scheidingstechniek fijner is en scheiding van R- en S-BAIBA toelaat.

De scheiding van R- en S-BAIBA gebeurt in gasvorm in de plaats van in liquide vorm met behulp van een Crownpak kolom in het gaschromatografietoestel (GC). De vloeibare stalen worden aldus eerst opgewarmd tot een temperatuur hoger dan het hoogste kookpunt van de aanwezige componenten, waardoor de vloeistof wordt omgezet in een gas. Dit gas wordt geïnjecteerd in het polaire draaggas. Hierna vindt dezelfde procedure plaats als hierboven beschreven bij HPLC, met als verschil dat de scheiding niet gebeurt op basis van polariteit, maar op basis van de verdampingssnelheid. De detectie van R- en S-BAIBA is eveneens verschillend en gebeurt aan de hand van een 'flame ionization detector'. Hierbij worden de gassen verbrand door een nauwkeurige vlam, die gevoed wordt door waterstof en lucht. Dit levert ionisatie op van de koolwaterstoffen, waardoor de elektrische geleidbaarheid van het gas wijzigt. Het is die geleidbaarheid die gemeten wordt door een elektrometer en de moleculen op een chromatogram weergeeft.

2.3. STATISTISCHE ANALYSE

De statistische analyses werden uitgevoerd met het SPSS programma (IBM Corp., released 2016, IBM SPSS statistics for Windows, Version 24.0, Armonk, NY), waarbij de resultaten significant bevonden werden wanneer p kleiner was dan 0,05. Voorafgaand aan de analyses werd de totale BAIBA-concentratie berekend door de som van S- en R-BAIBA te nemen.

Analyses gebeurden aan de hand van general linear models en meer specifiek repeated measures om verschillen in de BAIBA-concentraties tussen de twee condities overheen de tijd na te gaan. De invloed van het genotype en het geslacht werden nagegaan door beide apart als between factor toe te voegen aan de analyses. Bij een significant verschil tussen de genotype-groepen werden select cases gebruikt om verder te analyseren.

Om de verschillen in concentraties tussen de twee condities op één tijdstip te analyseren werd gebruik gemaakt van de paired samples t-test.

Voor de analyses van de BAIBA-concentraties op baseline werd gebruik gemaakt van de One-way ANOVA om verschillen tussen genotype enerzijds en geslacht anderzijds te bekijken.

Om de overgang van de BAIBA-concentraties van plasma naar urine te analyseren werden Pearsoncorrelatietesten gebruikt, waarbij het verschil in BAIBA-concentratie in het plasma (post-pre) gecorreleerd werd aan het verschil in BAIBA-concentratie in urine (post1u-pre).

3. Resultaten

Bij de bespreking van de resultaten wordt eerst de totale BAIBA-concentratie behandeld, die de som is van de S-BAIBA- en R-BAIBA-concentratie die gemeten werd. Nadien worden de verhoudingen van S- en R-BAIBA ten opzichte van de totale BAIBA besproken en wordt een blik geworpen op de verhouding van S-BAIBA op R-BAIBA onder invloed van een fysieke inspanning en in rust. Uiteindelijk wordt R-BAIBA gevolgd door S-BAIBA afzonderlijk besproken, waarbij aandacht besteed wordt aan de overgang van de concentraties van het plasma naar urine.

Uit de bloedanalyses worden de resultaten van 15 proefpersonen besproken, waarvan 7 met het genotype CC, 5 met het genotype CT en 3 met het genotype TT en waarvan 12 mannelijke proefpersonen en 3 vrouwelijke. Uit de urineanalyses volgen resultaten van slechts 12 proefpersonen, 10 mannelijke en 2 vrouwelijke, aangezien bepaalde metingen van 3 proefpersonen ontbraken en deze bijgevolg niet werden opgenomen in de analyse. Er valt hierbij één mannelijk en één vrouwelijk proefpersoon met het genotype TT en één mannelijk proefpersoon met het genotype CT weg. Aanvullend worden de resultaten van de preliminaire data weergegeven die zijn voortgekomen uit de urinemetingen van slechts 5 mannelijke proefpersonen.

Aangezien sommige analyses werden uitgevoerd op weinig proefpersonen, zullen de bekomen resultaten niet altijd even betrouwbaar zijn en dient er aldus kritisch naar gekeken te worden. Voorafgaand aan de analyses werd wel vastgesteld dat er geen significante verschillen te vinden waren tussen de antropometrische kenmerken van de groepen die samengesteld werden op basis van hun genotype.

3.1. TOTALE BAIBA-CONCENTRATIE

Hieronder worden de resultaten van de totale BAIBA-concentratie in het plasma en in de urine behandeld, waarbij telkens eerst de situatie op 'baseline-niveau' besproken wordt en nadien wat de invloed van een fysieke inspanning is op het BAIBA-verloop.

Als baseline-waarden worden de resultaten van de pre-meting gebruikt, wat wil zeggen dat de proefpersonen voorafgaand aan de meting reeds gegeten hadden en waardoor de factor voeding in rekening gebracht dient te worden bij het bekijken van de resultaten. Er wordt daarnaast telkens een vergelijking gemaakt tussen de pre-meting in de rustconditie en de fietsconditie om na te gaan of deze niet te veel verschillen van elkaar, aangezien er in de literatuur sprake is van een dag tot dag variabiliteit (Crumpler et al., 1951 en Fink et al., 1952). Indien er geen significant verschil is, wordt verder geanalyseerd op de pre-metingen van de fietsconditie.

3.1.1. BAIBA-concentratie in het plasma

De resultaten van de totale BAIBA-concentratie worden besproken voor enerzijds de pre-meting, welke als baseline beschouwd wordt en anderzijds voor de pre-, 30-, post- en post+30-metingen, waaruit het effect van de inspanning kan worden afgeleid (fig.12).

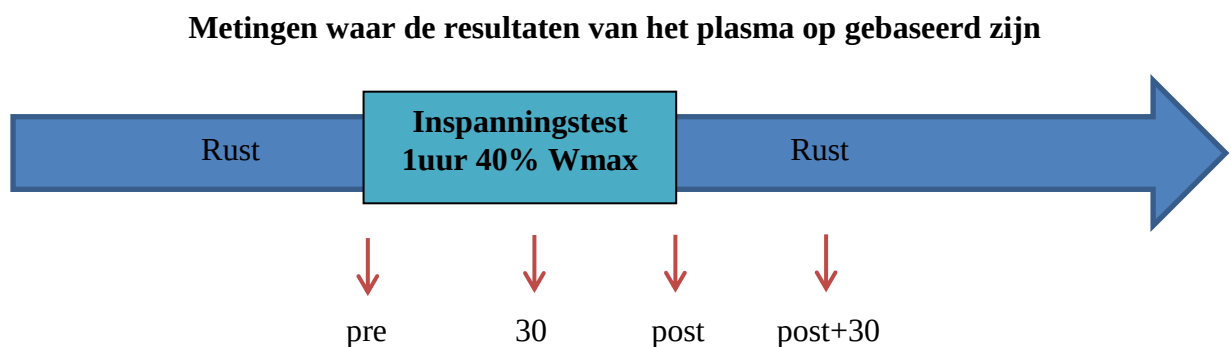


Fig. 12. Metingen uit het plasma die geanalyseerd werden en waarop de resultaten zijn gebaseerd. Pre-tijdstip wordt als baseline beschouwd in de bespreking van de resultaten.

3.1.1.1. BAIBA-concentratie op baseline in het plasma

Op de pre-meting van de fietsconditie bedroeg de gemiddelde BAIBA-concentratie $1,734 \pm 0,855 \mu\text{mol/l}$ en tijdens de rustdag bedroeg die gemiddeld $1,794 \pm 0,810 \mu\text{mol/l}$, wat niet significant verschillend is ($p=0,575$).

Afhankelijk van het genotype bepaald door rs37369 is er een significant verschil in BAIBA-concentratie ($p < 0,001$), namelijk tussen de proefpersonen met het genotype CC en het genotype TT, met respectievelijk $1,181 \pm 0,214 \mu\text{mol/l}$ en $3,159 \pm 0,548 \mu\text{mol/l}$ BAIBA ($p = 0,001$) en het genotype CT en TT ($p = 0,001$), waarvan de proefpersonen met CT een gemiddelde BAIBA-concentratie van $1,6531 \pm 0,524 \mu\text{mol/l}$ hebben. Tussen de proefpersonen met het genotype CC en CT is er geen significant verschil ($p = 0,158$) (fig.13).

De mannen hebben gemiddeld $1,605 \pm 0,751 \mu\text{mol/l}$ BAIBA en de vrouwen $2,248 \pm 1,235 \mu\text{mol/l}$ BAIBA in het plasma op baseline-niveau, wat niet significant verschillend is ($p = 0,259$).

BAIBA-concentraties in plasma afhankelijk van het genotype bepaald door rs37369

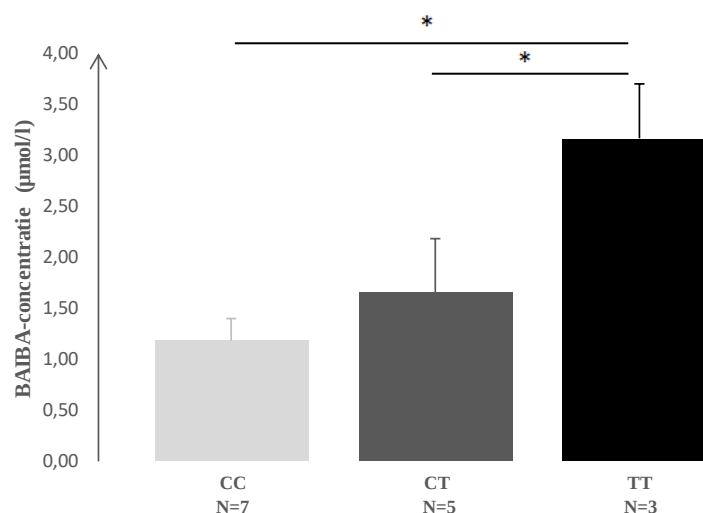


Fig. 13. Totale BAIBA-concentraties in het plasma op baseline (pre-meting van de fietsconditie), weergegeven per genotype van de proefpersonen. Significant verschil in BAIBA-concentratie tussen CC- en TT-groep en tussen CT- en TT-groep. * $p < 0,05$

3.1.1.2. BAIBA-concentratie onder invloed van een fysieke inspanning in plasma

Het verloop van de BAIBA-concentratie is significant verschillend tussen de fiets- en de rustconditie ($p < 0,001$). Tijdens de eerste 30 minuten van de aerobe fysieke inspanning is er reeds een stijging van 8,36% in de BAIBA-concentratie, namelijk van $1,734 \pm 0,221 \mu\text{mol/l}$ op de pre-meting naar $1,879 \pm 1,004 \mu\text{mol/l}$ op meting-30 ($p = 0,014$) en tijdens de volledige inspanning van één uur is er een stijging van 14,53% BAIBA, van $1,734 \pm 0,221 \mu\text{mol/l}$ op de pre-meting naar $1,986 \pm 1,020 \mu\text{mol/l}$ op de post-meting ($p < 0,001$), wat significant is ten opzichte van de rustconditie.

Na de fysieke inspanning is er een daling in de BAIBA-concentratie tot $1,853 \pm 0,925 \mu\text{mol/l}$, wat opnieuw significant is ten opzicht van de rustconditie die slechts een lichte daling kent naar $1,571 \mu\text{mol/l}$ ($p=0,013$). Dit betekent dat de toegenomen BAIBA-concentratie reeds met 52,77% gedaald is 30 minuten na het beëindigen van de inspanning (fig. 14).

Zoals hierboven reeds besproken is er op de pre-meting geen significant verschil in BAIBA-concentratie ($p=0,575$) en dit geldt eveneens voor de meting op 30 minuten na de start van de test ($p=0,287$). Op de tijdstippen post en post+30 is er echter wel een significant verschil in BAIBA-concentratie tussen de fietsconditie en de rustconditie van respectievelijk $0,402 \mu\text{mol/l}$ en $0,282 \mu\text{mol/l}$ BAIBA ($p<0,001$ en $p=0,003$).

Totale BAIBA-verloop in het plasma na een fysieke inspanning en in rust

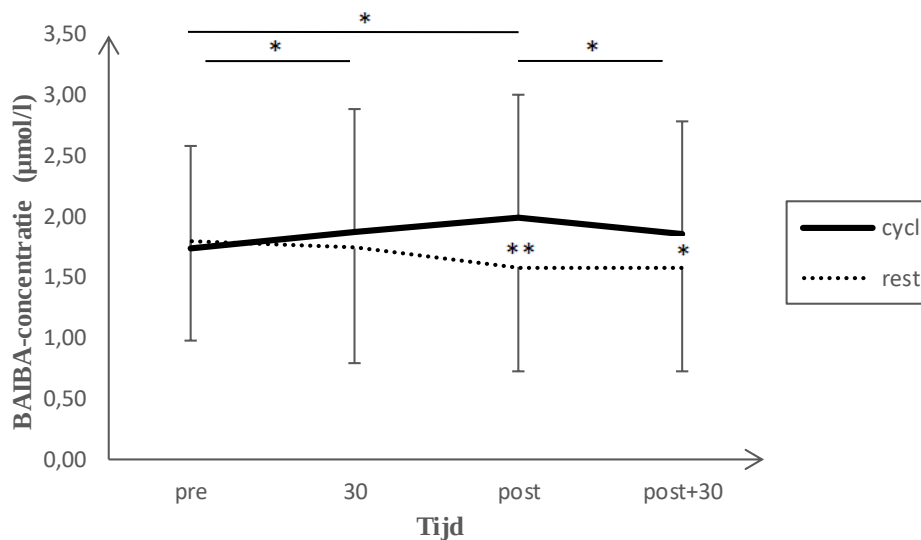


Fig. 14. Gemiddelde BAIBA-concentraties ($\mu\text{mol/l}$) en standaarddeviaties tijdens de fietsconditie en de rustconditie, waarbij op de post- en post+30-meting een significant verschil in BAIBA-concentratie is tussen de fiets- en rustconditie. Het BAIBA-verloop tussen de condities is eveneens significant verschillend, met een stijging in de fietsconditie van pre naar 30 en van pre naar post en een daling van post naar post+30 ten opzichte van de rustconditie.
* $p<0,05$ ** $p<0,001$

Invloed van het genotype op de BAIBA-concentratie in het plasma

Het genotype op rs37369 heeft geen significante invloed op het verloop van de totale BAIBA-concentratie na een fysieke inspanning ten opzichte van de rustconditie ($p=0,497$) (fig. 15). Er werd wel een hoofdeffect van genotype gevonden, wat betekent dat er een verschillende BAIBA-concentratie is tussen de genotypen ($p<0,001$).

Totale BAIBA-verloop in het plasma afhankelijk van het genotype bepaald door rs37369

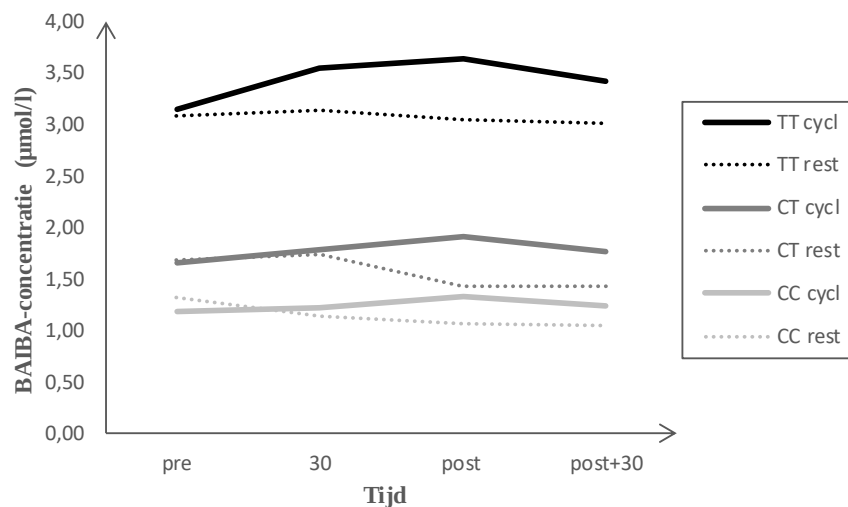


Fig. 15. Gemiddelde BAIBA-concentraties ($\mu\text{mol/l}$) tijdens de fietsconditie en de rustconditie afhankelijk van het genotype op rs37369. Er is geen significant verschil in BAIBA-verloop tussen de condities afhankelijk van het genotype.

Invloed van het geslacht op de BAIBA-concentratie in het plasma

Hierboven werd reeds aangetoond dat er een significant verschil is in BAIBA-verloop tussen de fietsconditie en de rusttoestand. Als de invloed van het geslacht in rekening gebracht wordt, is er een trend tot significantie ($p = 0,098$). Hieronder wordt daarom de analyse apart uitgevoerd voor de mannen en de vrouwen.

Bij de mannen is er een significant verschil in BAIBA-verloop tussen de condities ($n=12$; $p<0,001$), waarbij de BAIBA-concentratie in de fietsconditie van pre naar 30 en van pre naar post significant stijgt (respectievelijk $p<0,001$, $p<0,001$) en nadien lichtjes daalt van post naar post+30 ($p=0,094$) ten opzichte van de rustconditie. Op de tijdstippen pre en 30 is er geen significant verschil in BAIBA-concentratie tussen de fietsconditie en de rustconditie ($p=0,774$ en $p=0,079$), maar na de fysieke inspanning van één uur is de BAIBA-concentratie wel verschillend van de rustconditie, waarbij ze $0,403 \mu\text{mol/l}$ hoger ligt op de postmeting ($p=0,003$) en $0,326 \mu\text{mol/l}$ hoger op de post+30-meting ($p=0,004$). Bij de vrouwen is er geen significant verschil in het BAIBA-verloop tussen de twee condities ($n=3$; $p=0,178$) (fig. 16).

Totale BAIBA-verloop in het plasma afhankelijk van het gender

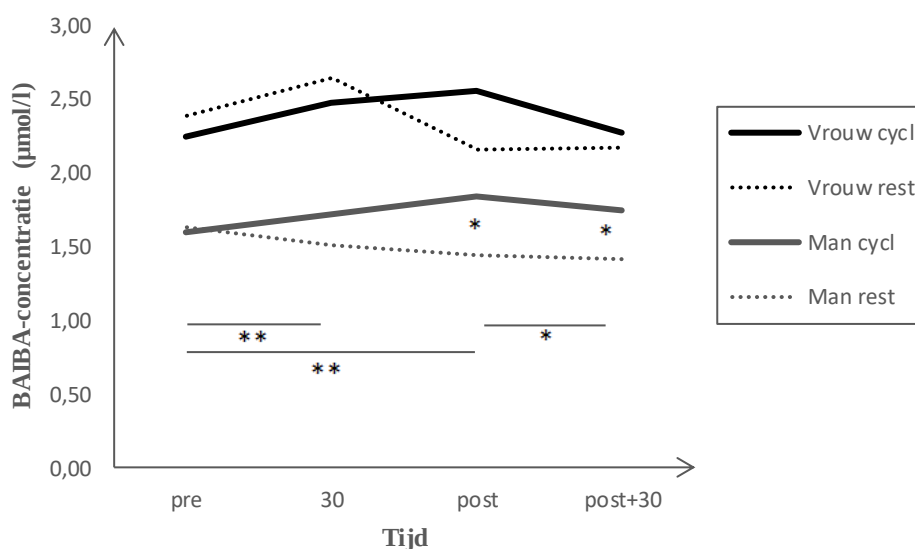


Fig. 16. Gemiddelde BAIBA-concentraties ($\mu\text{mol/l}$) tijdens en na een fysieke inspanning en in rust afhankelijk van het geslacht. Het BAIBA-verloop bij de mannen is significant verschillend tussen de twee condities, maar bij de vrouwen niet. Op de post- en post+30-meting is de BAIBA-concentratie bij de mannen verschillend tussen de twee condities. * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

3.1.2. BAIBA-concentratie in urine

BAIBA kan enerzijds worden afgebroken tot Propionyl-CoA om op die manier in de citroenzuurcyclus terecht te komen en anderzijds kan BAIBA in de urine terecht komen. Hieronder zal eerst gekeken worden naar de BAIBA-concentratie op baseline (pre-meting) in de urine en nadien naar het verloop van de BAIBA-concentratie onder invloed van een fysieke inspanning in vergelijking met de rustconditie, waarbij gebruikt gemaakt wordt van de pre- en post1u-meting. Nadien worden ook de resultaten van de preliminaire data besproken, welke bepaald zijn door de op pre-, post1u-, post2u30- en post4u-meting van vijf proefpersonen (fig.17). Om een accuraat beeld te krijgen van de BAIBA-concentraties in de urine, worden de concentraties telkens weergegeven ten opzichte van creatinine.

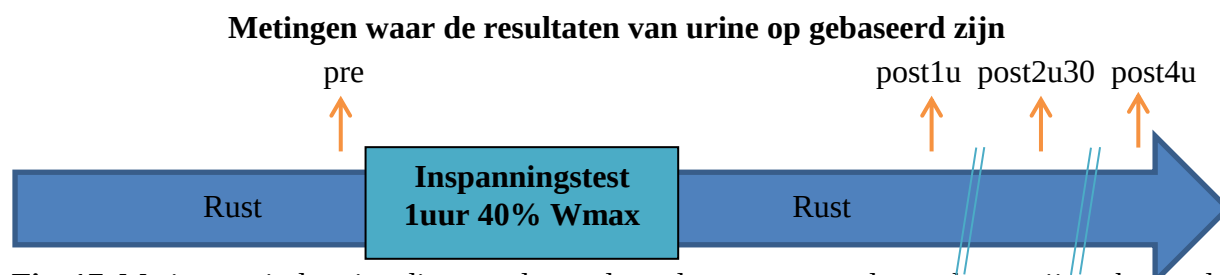


Fig. 17. Metingen uit de urine die geanalyseerd werden en waarop de resultaten zijn gebaseerd. Pre-tijdstip wordt als baseline beschouwd in de bespreking van de resultaten.

3.1.2.1. BAIBA-concentratie in de urine op baseline

Op de pre-meting van de fietsconditie bedroeg de gemiddelde BAIBA-concentratie in urine $23,814 \pm 40,608$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine en tijdens de rustdag bedroeg die gemiddeld $25,030 \pm 41,593$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine, wat niet significant verschillend is ($p=0,572$).

Afhankelijk van het genotype op rs37369 is er een significant verschil in BAIBA-concentratie ($p=0,013$), met gemiddeld $4,769 \pm 2,104$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine in de CC-groep, $34,382 \pm 47,743$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine in de CT-groep en $114,858 \pm 0,548$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine in de TT-groep (fig. 18). Post-hoc-analyse was niet mogelijk door een te laag aantal proefpersonen in de TT- en de CT-groep ($n=1$ en $n=4$).

De mannen hebben gemiddeld $17,235 \pm 34,689$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine BAIBA en de vrouwen $56,707 \pm 68,653$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine BAIBA in de urine op baseline-niveau, wat niet significant verschillend is ($p=0,225$).

BAIBA-concentraties in urine afhankelijk van het genotype bepaald door rs37369

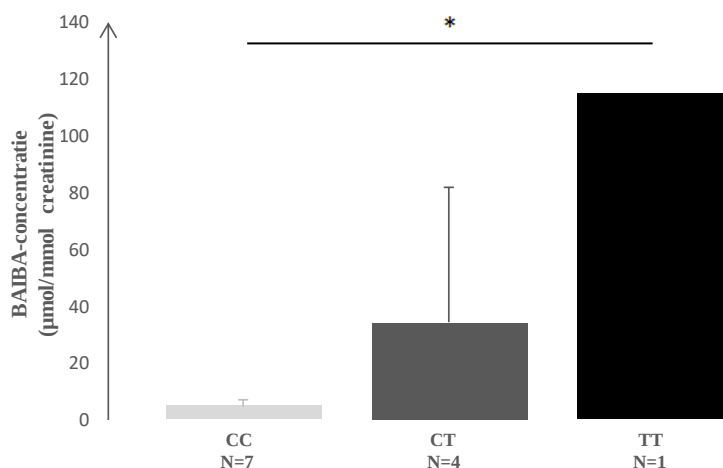


Fig. 18. Gemiddelde BAIBA-concentraties ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine) en standaarddeviaties in de urine op baseline (pre-meting van de fietsconditie), weergegeven per genotype van de proefpersonen. Significant verschil in BAIBA-concentratie tussen de verschillende genotypen CC, CT en TT. * $p<0,05$.

3.1.2.2. BAIBA-concentratie in de urine tijdens en na een fysieke inspanning

Het verloop van de BAIBA-concentratie onder invloed van de aerobe fysieke inspanning is niet significant verschillend ten opzichte van de rustconditie ($p=0,618$), waarbij de concentratie gaat van $23,814 \pm 40,608$ naar $22,371 \pm 42,190$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine in de fietsconditie en in rust van $25,030 \pm 41,593$ naar $24,104 \pm 43,152$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine. Op zowel het tijdstip pre als post1u is er geen significant verschil in BAIBA-concentratie tussen de fiets- en de rustconditie (respectievelijk $p=0,572$ en $p=0,803$) (fig. 19).

Totale BAIBA-verloop in de urine na een fysieke inspanning en in rust

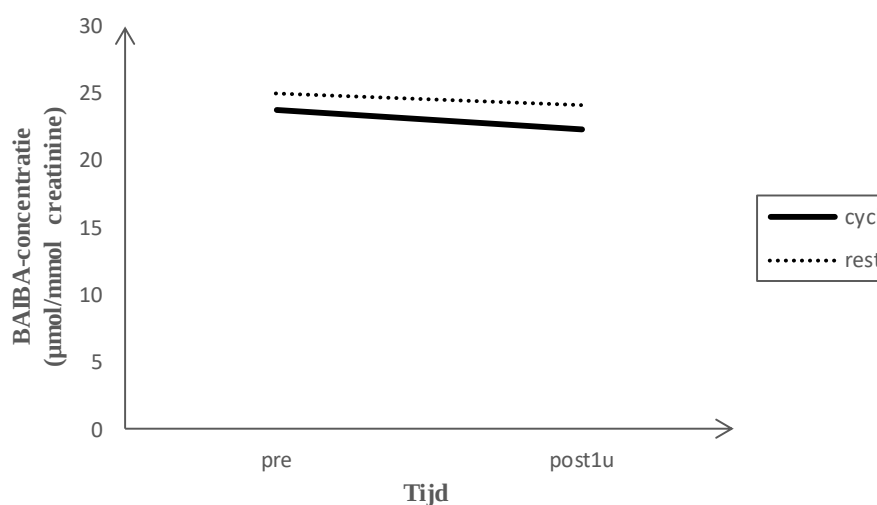


Fig. 19. Gemiddelde BAIBA-concentraties ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine) tijdens en na een fysieke inspanning en in rust, waarbij geen significante verschillen tussen de condities zijn. Standaarddeviaties worden niet weergegeven, maar liggen tussen de 40 en de 46 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine, wegens de verschillende genotypen.

Invloed van het genotype en het geslacht op het totaal BAIBA-verloop in de urine

Zowel genotype als geslacht hebben geen significant effect op het BAIBA-verloop na een fysieke inspanning in vergelijking met het BAIBA-verloop in rust (respectievelijk $p=0,399$ en $p=0,904$).

3.1.2.3. BAIBA-concentratie in de urine van vijf proefpersonen

Wat hieronder beschreven staat, wordt beschouwd als preliminaire data voor eventuele vervolgstudies. Er zijn namelijk vijf proefpersonen die aanvullend op de pre- en post1u-meting, ook op tijdstip post2u30 en tijdstip post4u metingen hebben. De proefpersonen zijn allemaal mannelijk, waarvan vier met het genotype CC en één met het genotype CT.

De invloed van het geslacht en het genotype zullen hier aldus niet geanalyseerd kunnen worden, maar er kan wel kritisch gekeken worden naar de resultaten die hieronder beschreven staan.

Het BAIBA-verloop van de vijf proefpersonen onder invloed van een aerobe fysieke inspanning is niet verschillend van het BAIBA-verloop in de rustconditie ($p=0,391$). Op alle vier de tijdstippen is er eveneens geen significant verschil in BAIBA-concentratie tussen de fietsconditie en de rustconditie.

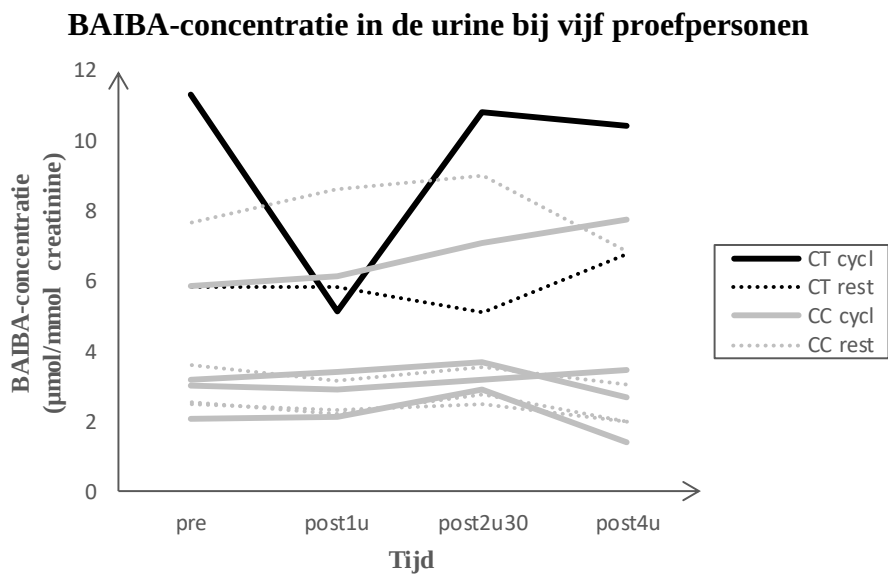


Fig. 20. De BAIBA-concentraties ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine) in urine overheen de tijd voor alle vijf de proefpersonen, waarbij geen significant verschil in BAIBA-verloop is tussen de fietsconditie en de rustconditie.

Op de figuur is duidelijk te zien dat het verloop van de BAIBA-concentratie anders is bij de CT-proefpersoon in vergelijking met de CC-proefpersonen (fig. 20), voornamelijk op tijdstip post1u is er een daling zichtbaar die niet aanwezig is bij de CC-groep. Aangezien hier geen statistiek op toegepast werd, kunnen hier ook geen conclusies uit getrokken worden.

Tijdstip	Gemiddelde BAIBA-concentratie $\pm$ SD ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)	
	Fietsconditie	Rustconditie
Pre	5,103 $\pm$ 3,751	4,437 $\pm$ 2,264
Post1u	3,949 $\pm$ 1,659	4,433 $\pm$ 2,756
Post2u30	5,542 $\pm$ 3,408	4,586 $\pm$ 2,671
Post4u	5,160 $\pm$ 3,789	4,138 $\pm$ 2,489

Tabel 3. BAIBA-concentratie in de urine bij een steekproef van vijf proefpersonen

3.2. VERHOUDING S- EN R-BAIBA

BAIBA bestaat uit 2 enantiomeren, namelijk R- en S-BAIBA. In de literatuur is er onenigheid over de verhouding waarin R-BAIBA en S-BAIBA voorkomen in het plasma en in de urine. Hieronder worden de bevindingen van dit onderzoek weergegeven met betrekking tot de verhouding van S- en R-BAIBA ten opzichte van de totale BAIBA-concentratie op baseline, onder invloed van een fysieke inspanning en in rust. De resultaten op baseline komen voort uit de pre-meting van de fietsconditie, welke als baseline beschouwd worden, maar waar kritisch naar gekeken dient te worden aangezien voorafgaand aan de meting gegeten werd.

3.2.1. Verhouding van S- en R-BAIBA in het plasma

3.2.1.1. Verhouding S- op R-BAIBA op baseline in het plasma

Van de totale BAIBA-concentratie in het plasma is gemiddeld $2,048\% \pm 1,096\%$ S-BAIBA en $97,952\% \pm 1,096\%$ R-BAIBA. Afhankelijk van het genotype op rs37369 is de verhouding van zowel R- als S-BAIBA op de totale BAIBA-concentratie verschillend tussen de genotypes CC en TT ($p=0,007$), waarbij de S-BAIBA-concentratie hoger is en de R-BAIBA-concentratie lager is bij de proefpersonen met het genotype CC in vergelijking met het genotype TT. Tussen de genotypes CC en CT enerzijds en CT en TT anderzijds is er geen significant verschil (respectievelijk $p=0,123$ en $p=0,193$). Afhankelijk van het geslacht is er ook een significant verschil in de verhoudingen voor zowel S- als R-BAIBA, waarbij de mannen meer S-BAIBA hebben en minder R-BAIBA ten opzichte van de totale BAIBA-concentratie in vergelijking met de vrouwen ($p=0,048$) (fig. 23).

3.2.1.2. Verhouding S- op R-BAIBA tijdens en na een fysieke inspanning in het plasma

De verhouding van S-BAIBA op R-BAIBA in het plasma wijzigt onder invloed van een fysieke inspanning van één uur ten opzichte van de rustconditie ($p<0,001$). Tijdens de eerste 30 minuten van de fysieke inspanning is er geen significant verschil met de rustconditie ($p=0,920$), maar overheen de volledige inspanning van één uur is er wel een significant verschil in verloop ($p=0,001$), waarbij de verhouding van S-BAIBA op R-BAIBA minder toeneemt dan tijdens de rustconditie. Na de fysieke inspanning neemt de verhouding meer toe in de fietsconditie dan in de rustconditie tot aan tijdstip post+30 ($p=0,046$) (fig. 21).

Op tijdstip post werd een significant verschil gevonden in de verhouding van S-BAIBA op R-BAIBA ($p=0,049$), waarbij de verhouding in de rustconditie hoger is dan in de fietsconditie. Op de andere tijdstippen werd geen significant verschil gevonden tussen de verhouding in de fietsconditie en de rustconditie: pre ($p=0,827$), 30 ($p=0,776$) en post+30 ($p=0,424$).

Afhankelijk van het genotype en het geslacht is er geen significant verschil in de verandering van de verhouding tijdens de fietsconditie ten opzichte van de rustconditie (respectievelijk $p=0,138$ en $p=0,625$).

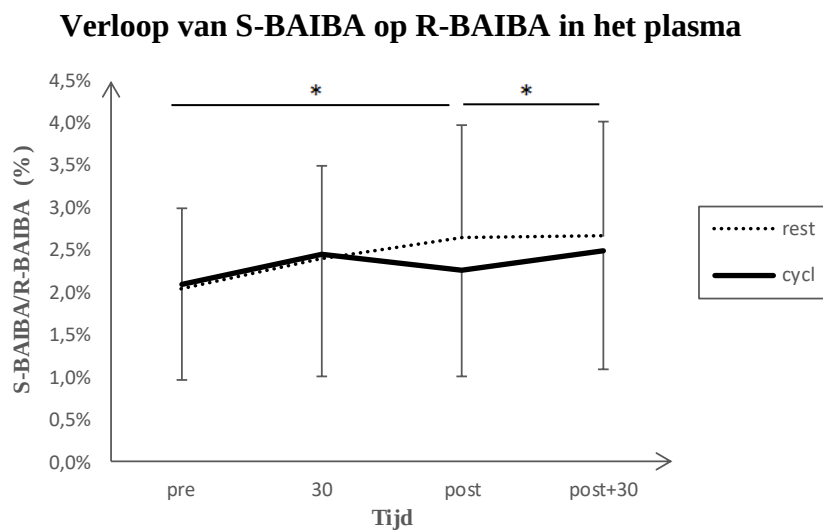


Fig. 21. Verloop van de verhouding, S-BAIBA op R-BAIBA, tijdens en na een fysieke inspanning en in rust, waarbij een significant interactie-effect is van tijd en conditie, meer specifiek tussen tijdstip pre en post en tijdstip post en post+30. * $p<0,05$

3.2.2. Verhouding van S- en R-BAIBA in urine

3.2.2.1. Verhouding van S- en R-BAIBA op baseline in urine

Van de totale BAIBA-concentratie in de urine is gemiddeld $1,729\% \pm 1,645\%$ S-BAIBA en $98,271\% \pm 1,645\%$ R-BAIBA. Afhankelijk van het genotype op rs37369 is de verhouding van zowel R- als S-BAIBA op de totale BAIBA-concentratie niet significant verschillend tussen de genotypes CC, CT en TT ($p=0,527$). Tussen de mannen en de vrouwen is er eveneens geen significant verschil ($p=0,285$) (fig. 23).

3.2.2.2. Verhouding S- op R-BAIBA tijdens en na een fysieke inspanning in urine

Het verloop van de verhouding S-BAIBA op R-BAIBA is niet significant verschillend tussen de fietsconditie en de rustconditie ($p = 0,482$), ook het genotype en het geslacht oefenen er geen significante invloed op uit (respectievelijk $p = 0,831$ en $p = 0,653$) (fig. 22).

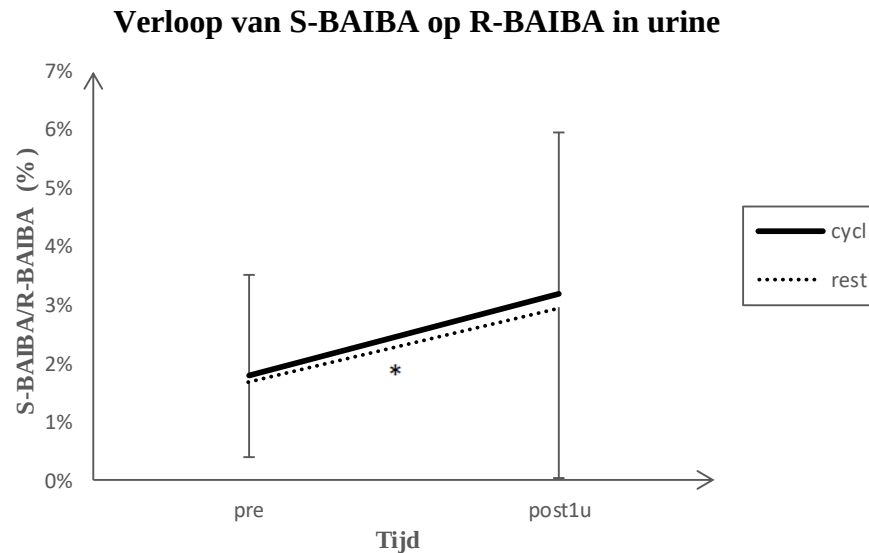


Fig. 22. De verhouding van S-BAIBA op R-BAIBA tijdens en na een fysieke inspanning en in rust is niet significant verschillend van elkaar.

Verhoudingen van S- en R-BAIBA op totaal-BAIBA op baseline in plasma en in urine

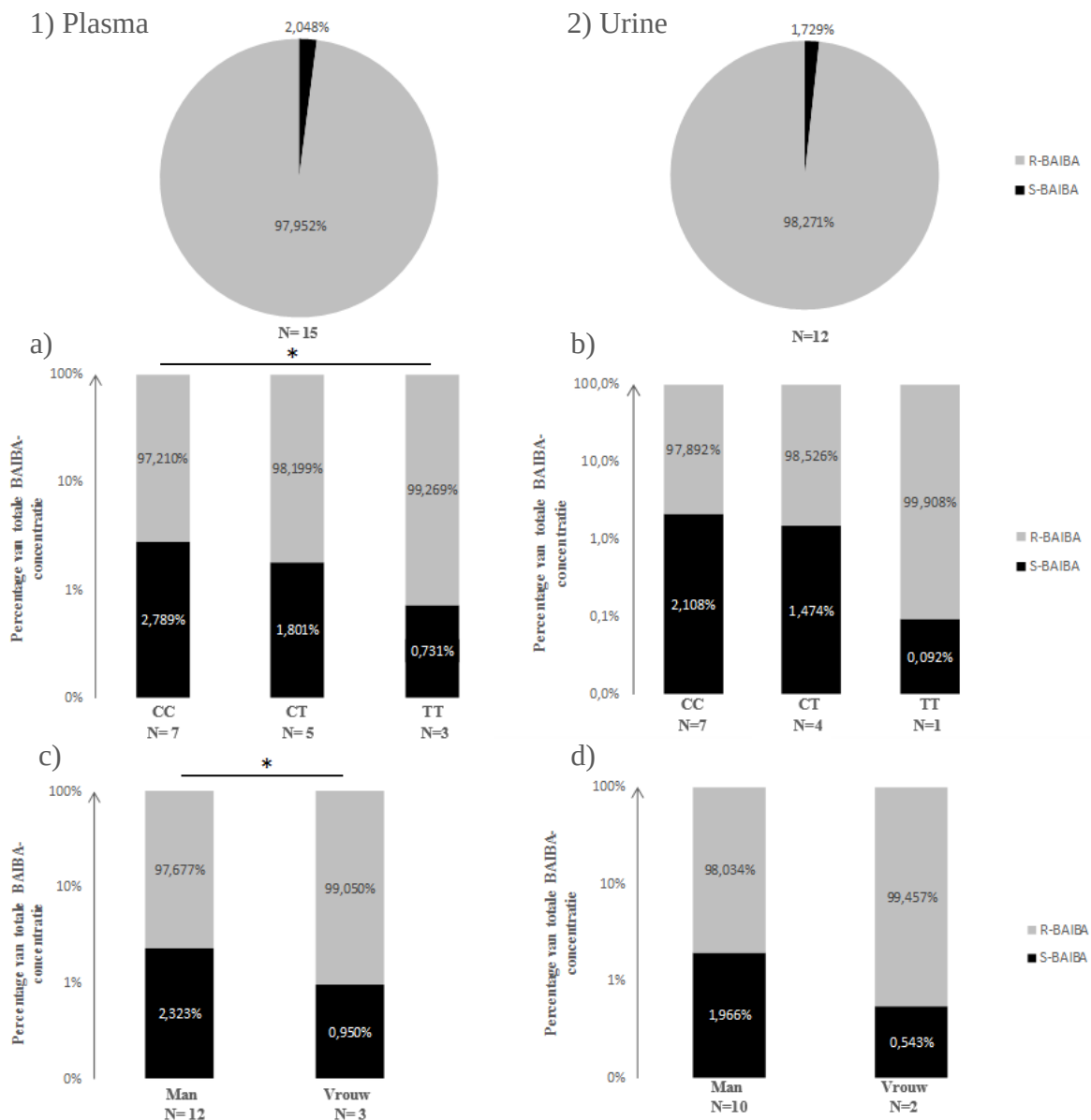


Fig. 23. Verhoudingen van S-BAIBA en R-BAIBA ten opzichte van de totale BAIBA-concentratie weergegeven op een logaritmische schaal (1) in het plasma en (2) in de urine op baseline: (a) afhankelijk van het genotype in het plasma waarbij de verhouding significant verschillend is tussen de CC- en de TT-groep, (b) afhankelijk van het genotype in de urine, (c) afhankelijk van het geslacht in het plasma waar de verhouding significant verschillend is tussen man en vrouw en (d) afhankelijk van het geslacht in de urine. * $p < 0,05$

3.3. R-BAIBA-CONCENTRATIE

Uit de verhoudingen van S- en R-BAIBA op de totale BAIBA-concentratie (fig. 21) blijkt dat R-BAIBA minstens 97% van de totale BAIBA-concentratie inhoudt. De analyses die op R-BAIBA werden uitgevoerd leverden dan ook dezelfde resultaten op als bij de totale BAIBA-concentratie, waardoor de analyses op R-BAIBA hieronder niet staan uitgeschreven. Aangezien de concentraties wel verschillend zijn van de totale BAIBA-concentraties, worden deze wel weergegeven zowel voor plasma als voor urine op baseline-niveau, tijdens en na een fysieke inspanning en in rust.

3.3.1. R-BAIBA in het plasma

3.3.1.1. R-BAIBA in het plasma op baseline

Gemiddelde R-BAIBA-concentratie in het plasma op baseline + SD ($\mu\text{mol/l}$)	Totaal	1,705 $\pm$ 0,859
	CC	1,149 $\pm$ 0,213
	CT	1,626 $\pm$ 0,528
	TT	3,137 $\pm$ 0,549
	Man	1,574 $\pm$ 0,755
	Vrouw	2,230 $\pm$ 1,233

Tabel 4: R-BAIBA-concentraties ($\mu\text{mol/l}$) en standaarddeviaties in het plasma op baseline (pre-meting van fietsconditie), waarbij een onderscheid gemaakt wordt tussen de gemiddelde R-BAIBA-concentratie van alle proefpersonen ($n=15$), de concentraties per genotype (CC: $n=7$; CT: $n=5$; TT: $n=3$) en per geslacht (man: $n=12$; vrouw: $n=3$).

3.3.1.2. R-BAIBA in het plasma tijdens en na een fysieke inspanning

		Pre	30	Post	Post+30
Gemiddelde R-BAIBA-concentratie na een fysieke inspanning + SD ($\mu\text{mol/l}$)	Totaal	1,705 $\pm$ 0,859	1,848 $\pm$ 1,010	1,952 $\pm$ 1,025	1,818 $\pm$ 0,930
	CC	1,149 $\pm$ 0,213	1,186 $\pm$ 0,234	1,281 $\pm$ 0,268	1,199 $\pm$ 0,258
	CT	1,626 $\pm$ 0,528	1,760 $\pm$ 0,642	1,888 $\pm$ 0,702	1,732 $\pm$ 0,570
	TT	3,137 $\pm$ 0,549	3,537 $\pm$ 0,566	3,623 $\pm$ 0,612	3,405 $\pm$ 0,251
	Man	1,574 $\pm$ 0,755	1,695 $\pm$ 0,924	1,806 $\pm$ 0,920	1,710 $\pm$ 0,873
	Vrouw	2,230 $\pm$ 1,233	2,460 $\pm$ 1,319	2,537 $\pm$ 1,433	2,250 $\pm$ 1,229
Gemiddelde R-BAIBA-concentratie in rust + SD ($\mu\text{mol/l}$)	Totaal	1,763 $\pm$ 0,811	1,710 $\pm$ 0,945	1,552 $\pm$ 0,863	1,539 $\pm$ 0,855
	CC	1,286 $\pm$ 0,426	1,106 $\pm$ 0,316	1,025 $\pm$ 0,280	1,019 $\pm$ 0,304
	CT	1,656 $\pm$ 0,461	1,718 $\pm$ 0,831	1,408 $\pm$ 0,430	1,398 $\pm$ 0,465
	TT	3,057 $\pm$ 0,547	3,105 $\pm$ 0,614	3,022 $\pm$ 0,583	2,988 $\pm$ 0,515
	Man	1,610 $\pm$ 0,654	1,481 $\pm$ 0,716	1,405 $\pm$ 0,693	1,388 $\pm$ 0,702
	Vrouw	2,377 $\pm$ 1,243	2,627 $\pm$ 1,363	2,140 $\pm$ 1,385	2,147 $\pm$ 1,312

Tabel 5: R-BAIBA-concentraties ($\mu\text{mol/l}$) en standaarddeviaties in het plasma tijdens en na een fysieke inspanning en in rust, waarbij een onderscheid gemaakt wordt tussen de gemiddelde R-BAIBA-concentraties van alle proefpersonen ($n=15$), de concentraties per genotype (CC: $n=7$; CT: $n=5$; TT: $n=3$) en per geslacht (man: $n=12$; vrouw: $n=3$) op elk tijdstip.

3.3.2. R-BAIBA in de urine

3.3.2.1. R-BAIBA in de urine op baseline

Gemiddelde R-BAIBA-concentratie in de urine op baseline + SD ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)	Totaal	30,696 $\pm$ 46,301
	CC	4,675 $\pm$ 2,089
	CT	34,293 $\pm$ 47,731
	TT	114,579 $\pm$ 0,245
	Man	17,142 $\pm$ 34,684
	Vrouw	75,877 $\pm$ 58,895

Tabel 6: R-BAIBA-concentraties ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine) en standaarddeviaties in de urine op baseline (pre-meting van fietsconditie), waarbij een onderscheid gemaakt wordt tussen de gemiddelde R-BAIBA-concentratie van alle proefpersonen ($n=12$), de concentraties per genotype (CC: $n=7$; CT: $n=4$; TT: $n=1$) en per geslacht (man: $n=10$; vrouw: $n=2$).

3.3.2.2. R-BAIBA in de urine tijdens en na een fysieke inspanning

		Pre	Post1u
Gemiddelde R-BAIBA-concentratie na een fysieke inspanning + SD ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)	Totaal	30,696 $\pm$ 46,301	30,158 $\pm$ 49,440
	CC	4,675 $\pm$ 2,089	3,820 $\pm$ 1,317
	CT	34,293 $\pm$ 47,731	31,099 $\pm$ 51,996
	TT	114,579 $\pm$ 0,245	120,462 $\pm$ 6,451
	Man	17,142 $\pm$ 34,684	15,385 $\pm$ 35,383
	Vrouw	75,877 $\pm$ 58,895	79,402 $\pm$ 65,603
Gemiddelde R-BAIBA-concentratie in rust + SD ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)	Totaal	32,862 $\pm$ 49,003	32,394 $\pm$ 51,270
	CC	5,016 $\pm$ 2,772	4,802 $\pm$ 2,626
	CT	40,302 $\pm$ 55,286	36,304 $\pm$ 57,889
	TT	115,440 $\pm$ 17,660	121,150 $\pm$ 17,413
	Man	17,260 $\pm$ 31,266	15,952 $\pm$ 32,829
	Vrouw	84,869 $\pm$ 68,805	87,201 $\pm$ 71,165

Tabel 7: R-BAIBA-concentraties ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine) en standaarddeviaties in de urine tijdens en na een fysieke inspanning en in rust, waarbij een onderscheid gemaakt wordt tussen de gemiddelde R-BAIBA-concentraties van alle proefpersonen ($n=12$), de concentraties per genotype (CC: $n=7$; CT: $n=4$; TT: $n=1$) en per geslacht (man: $n=10$; vrouw: $n=2$) op elk tijdstip.

3.3.2.3. R-BAIBA in de urine tijdens en na een fysieke inspanning bij 5 proefpersonen

Net zoals bij de totale BAIBA worden hier ook de waarden van de preliminaire data weergegeven, welke bestaan uit de R-BAIBA-concentraties van vijf proefpersonen die aanvullend op de pre- en post-meting, ook op tijdstip 2u30 en tijdstip 4u metingen hebben. De proefpersonen zijn allemaal mannelijk, waarvan vier met het genotype CC en één met het genotype CT (tabel 8).

		Pre	Post1u	Post2u30	Post4u
Gemiddelde R-BAIBA-concentratie na een fysieke inspanning + SD ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)	Totaal	5,035 $\pm$ 3,749	3,816 $\pm$ 1,691	5,422 $\pm$ 3,424	5,025 $\pm$ 3,797
	CC	3,482 $\pm$ 1,627	3,496 $\pm$ 1,769	4,088 $\pm$ 1,944	3,686 $\pm$ 2,693
	CT	11,250	5,096	10,755	10,385
Gemiddelde R-BAIBA-concentratie in rust + SD ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)	Totaal	4,355 $\pm$ 2,272	4,293 $\pm$ 2,775	4,429 $\pm$ 2,643	3,991 $\pm$ 2,498
	CC	3,993 $\pm$ 2,451	3,920 $\pm$ 3,056	4,283 $\pm$ 3,029	3,315 $\pm$ 2,296
	CT	5,803	5,785	5,014	6,697

Tabel 8: R-BAIBA-concentraties ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine) en standaarddeviaties in de urine tijdens en na een fysieke inspanning en in rust, waarbij een onderscheid gemaakt wordt tussen de gemiddelde R-BAIBA-concentraties van alle proefpersonen ($n=5$) en de concentraties per genotype (CC: $n=4$; CT: $n=1$) op elk tijdstip.

3.3.3. Overgang van R-BAIBA-concentratie van plasma naar urine

Hieronder wordt aan de hand van Pearsoncorrelatietesten nagegaan of er significante correlaties zijn tussen de R-BAIBA-concentraties in het plasma en in de urine. Er wordt niet verder geanalyseerd per genotype en per geslacht omdat er wegens het lage aantal proefpersonen per groep geen betrouwbare correlaties vastgesteld kunnen worden.

In rust is er een positieve correlatie tussen de verandering in R-BAIBA-concentratie in het plasma en de verandering in urine ($r=0,562$, $p=0,036$), waarbij een daling van R-BAIBA in het plasma gepaard gaat met een daling van R-BAIBA in urine (fig. 24). Bij een aerobe fysieke inspanning van één uur is er geen correlatie tussen de verandering in R-BAIBA-concentratie in het plasma en de verandering in urine ($r=0,170$; $p=0,562$), wat verschillend is van de rustconditie waar er wel een correlatie is.

Correlatie tussen de verandering in R-BAIBA-concentratie in plasma en in urine

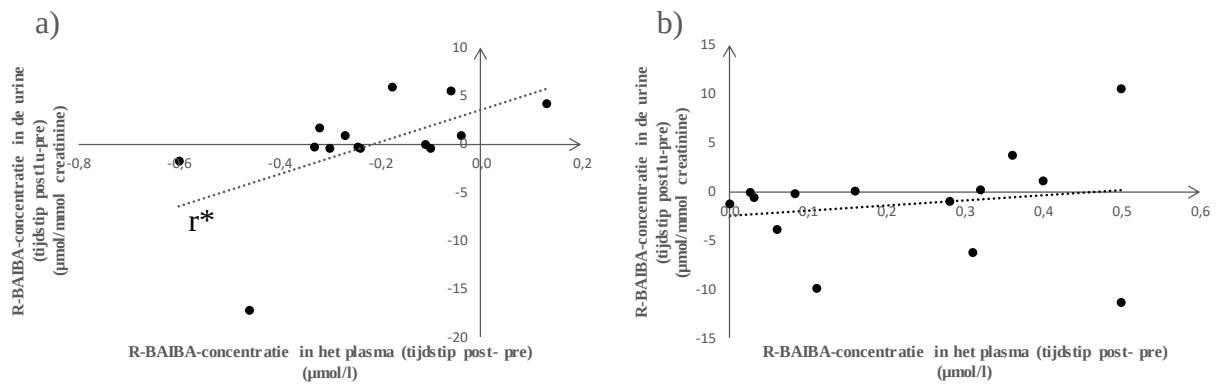


Fig. 24. De veranderingen in R-BAIBA-concentratie in het plasma en in urine (a) met een positieve correlatie tijdens de rustconditie en (b) zonder correlatie tijdens een aerobe fysieke inspanning van één uur. r^* ($p < 0,05$).

3.4. S-BAIBA-CONCENTRATIE

3.4.1 S-BAIBA in het plasma

Net zoals bij de bespreking van de totale BAIBA-concentratie zullen eerst de ‘baseline’-waarden besproken worden en nadien de invloed van een fysieke inspanning op de S-BAIBA-concentratie.

3.4.1.1. S-BAIBA in het plasma op baseline

Op de pre-meting van de fietsconditie bedroeg de gemiddelde S-BAIBA-concentratie $0,028 \pm 0,008 \mu\text{mol/l}$ en tijdens de rustdag bedroeg die gemiddeld $0,030 \pm 0,007 \mu\text{mol/l}$, wat niet significant verschillend is ($p=0,356$).

De proefpersonen met het genotype CC, bepaald door rs37369, hebben gemiddeld $0,032 \pm 0,009 \mu\text{mol/l}$ S-BAIBA, de proefpersonen met het genotype CT $0,027 \pm 0,008 \mu\text{mol/l}$ en de groep met het genotype TT heeft gemiddeld $0,023 \pm 0,001 \mu\text{mol/l}$ S-BAIBA, wat niet significant verschillend is ($p=0,215$).

De mannen hebben een hogere S-BAIBA-concentratie, met gemiddeld $0,031 \pm 0,007 \mu\text{mol/l}$, dan de vrouwen, die gemiddeld $0,018 \pm 0,004 \mu\text{mol/l}$ S-BAIBA hebben in het plasma ($p=0,015$) (fig. 25).

S-BAIBA-concentratie in het plasma op baseline afhankelijk van het gender

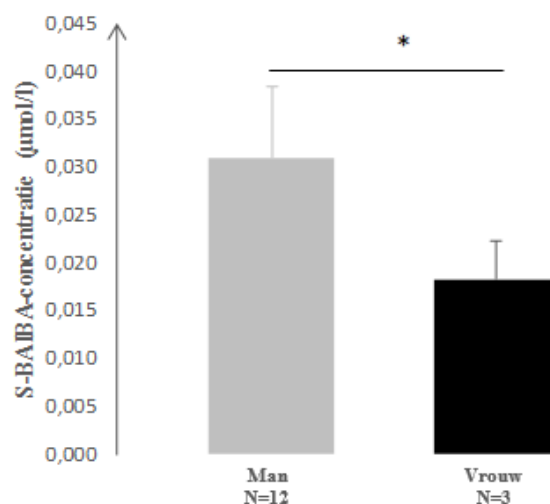


Fig. 25. Gemiddelde S-BAIBA-concentraties en standaarddeviaties in het plasma op baseline (pre-meting van de fietsconditie), weergegeven per gender van de proefpersonen. Significant verschil in S-BAIBA-concentratie tussen mannen en vrouwen. * $p<0,05$

3.4.1.2. S-BAIBA in het plasma tijdens en na een fysieke inspanning

Het verloop van de S-BAIBA-concentratie is significant verschillend tussen de fiets- en de rustconditie ($p=0,002$). Tijdens de eerste 30 minuten van de aerobe fysieke inspanning gaat de S-BAIBA-concentratie van $0,028 \pm 0,009 \mu\text{mol/l}$ naar $0,031 \pm 0,009 \mu\text{mol/l}$, wat niet significant verschillend is van het S-BAIBA-verloop in de rustconditie ($p=0,654$). Na één uur fietsen is er wel een significante stijging in S-BAIBA in vergelijking met de rustconditie, waarbij de concentratie van $0,028 \pm 0,009 \mu\text{mol/l}$ op de premeting naar $0,034 \pm 0,011 \mu\text{mol/l}$ op de postmeting gaat ($p=0,001$) en aldus een stijging van 21,43% vertoont. Na de fysieke inspanning is er geen daling in S-BAIBA-concentratie, maar een verdere stijging ten opzichte van de premeting waarbij de S-BAIBA-concentratie stijgt tot $0,035 \pm 0,012 \mu\text{mol/l}$ op de post+30-meting, wat significant is in vergelijking met het verloop in de rustconditie ($p<0,001$) (fig. 26).

Zoals hierboven reeds besproken is er op de pre-meting geen significant verschil in S-BAIBA-concentratie ($p=0,356$) en dit geldt eveneens voor de andere drie tijdstippen: 30 ($p=0,532$), post ($p=0,423$) en post+30 ($p=0,104$).

S-BAIBA-verloop in het plasma na een fysieke inspanning en in rust

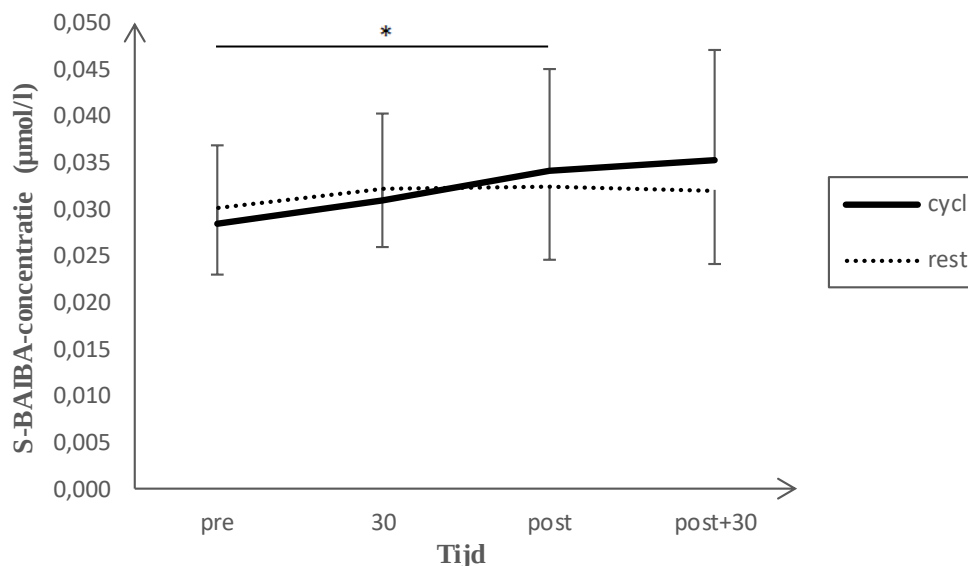


Fig. 26. Gemiddelde S-BAIBA-concentraties ($\mu\text{mol/l}$) en standaarddeviaties tijdens en na een fysieke inspanning en in rust. S-BAIBA-verloop significant verschillend tussen de condities tijdstip pre naar post. * $p<0,05$

Invloed van het genotype en het geslacht op de S-BAIBA-concentratie in het plasma

Zowel genotype als geslacht hebben geen significant effect op het S-BAIBA-verloop na een fysieke inspanning in vergelijking met het S-BAIBA-verloop in rust (respectievelijk $p=0,725$ en $p=0,291$).

3.4.2. S-BAIBA in de urine

S-BAIBA maakt deel uit van de totale BAIBA-concentratie die zich in de urine bevindt. Hieronder wordt nagegaan hoe groot die concentratie op baseline is en nadien wat de invloed van een fysieke inspanning hierop is.

3.4.2.1. S-BAIBA in de urine op baseline

Op de pre-meting van de fietsconditie bedroeg de gemiddelde S-BAIBA-concentratie in urine $0,093 \pm 0,054$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine en tijdens de rustdag bedroeg die gemiddeld $0,091 \pm 0,044$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine, wat niet significant verschillend is ($p=0,881$).

De proefpersonen met het genotype CC op rs37369, hebben gemiddeld $0,094 \pm 0,072$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine S-BAIBA, de proefpersonen met het genotype CT $0,082 \pm 0,022$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine en die met het genotype TT $0,106$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine, wat niet significant verschillend is ($p=0,904$).

De mannen hebben gemiddeld $0,090 \pm 0,058$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine S-BAIBA en de vrouwen $0,095 \pm 0,020$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine S-BAIBA in de urine op baseline, wat niet significant verschillend is ($p=0,910$).

3.4.2.2. S-BAIBA in de urine tijdens en na een fysieke inspanning

Het verloop van de S-BAIBA-concentratie onder invloed van een aerobe fysieke inspanning is niet significant verschillend ten opzichte van de rustconditie ($p=0,189$), waarbij de concentratie gaat van $0,093 \pm 0,054$ naar $0,119 \pm 0,051$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine in de fietsconditie en in rust van $0,091 \pm 0,044$ naar $0,132 \pm 0,056$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine (fig. 27). Op zowel het tijdstip pre als post1u is er geen significant verschil in S-BAIBA-concentratie tussen de fiets- en de rustconditie (respectievelijk $p=0,881$ en $p=0,165$).

S-BAIBA-verloop in de urine na een fysieke inspanning en in rust

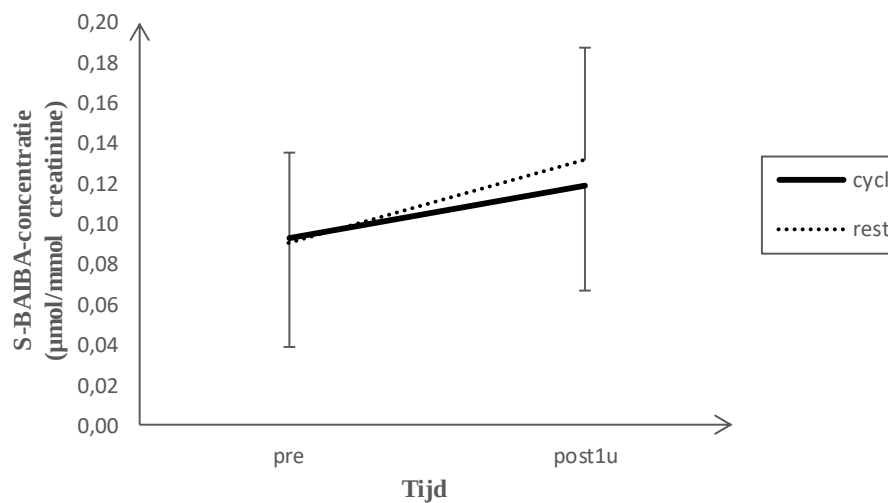


Fig. 27. Gemiddelde S-BAIBA-concentraties ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine) en standaarddeviaties tijdens en na een fysieke inspanning en in rust, waarbij geen significante verschillen tussen de condities zijn.

Invloed van het genotype en het geslacht op de S-BAIBA-concentratie in de urine

Zowel genotype als geslacht hebben geen significant effect op het S-BAIBA-verloop na een fysieke inspanning in vergelijking met het S-BAIBA-verloop in rust (respectievelijk $p=0,856$ en $p=0,223$).

3.4.2.3. S-BAIBA in de urine tijdens en na een fysieke inspanning bij 5 proefpersonen

Onderstaande gegevens maken opnieuw deel uit van preliminaire data in functie van eventuele toekomstige studies, aangezien er slechts vijf proefpersonen zijn die op alle vier de tijdstippen metingen hebben. Het S-BAIBA-verloop van de vijf proefpersonen onder invloed van een aerobe fysieke inspanning is niet verschillend van het S-BAIBA-verloop in de rustconditie ($p=0,629$) (fig. 28). Op tijdstip pre, post1u en post4u is er geen significant verschil in de S-BAIBA-concentratie tussen de fietsconditie en de rustconditie, maar op tijdstip post2u30 wel met een concentratie van $0,120 \pm 0,038 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine in de fietsconditie enerzijds en $0,157 \pm 0,055 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine in de rustconditie anderzijds ($p=0,032$).

Analyses om de invloed van het genotype te bekijken waren niet mogelijk omdat er slechts één proefpersoon genotype CT had en de andere vier genotype CC hadden. Uit de grafiek kan ook niet echt afgeleid worden dat er een verschillend verloop zou zijn, maar hierover is geen zekerheid.

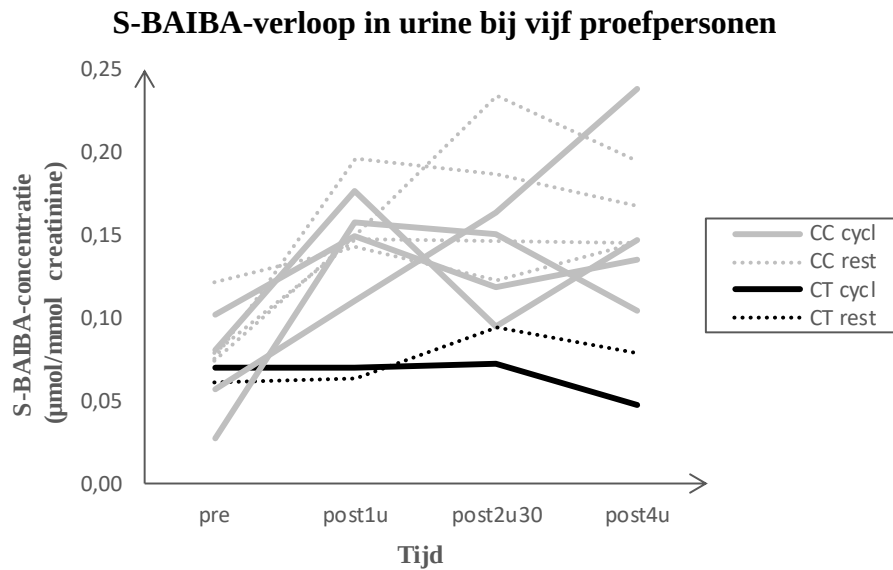


Fig. 28. Het S-BAIBA-verloop ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine) in urine voor alle vijf de proefpersonen apart, waarbij geen significant verschil in S-BAIBA-verloop is tussen de fietsconditie en de rustconditie voor de vijf proefpersonen samen.

3.4.3. Overgang van S-BAIBA-concentratie van plasma naar urine

Hieronder wordt aan de hand van Pearsoncorrelatietesten nagegaan of er significante correlaties zijn tussen de S-BAIBA-concentraties in het plasma en in de urine. Er wordt niet verder geanalyseerd per genotype en per geslacht omdat er wegens het lage aantal proefpersonen per groep geen betrouwbare correlaties vastgesteld kunnen worden.

In rust is er een trend tot een significante positieve correlatie tussen de verandering in S-BAIBA-concentratie in het plasma en de verandering in urine ($r=0,494$; $p=0,086$), waarbij een stijging van S-BAIBA in het plasma gepaard gaat met een stijging van S-BAIBA in urine.

Bij een aerobe fysieke inspanning van één uur is er geen correlatie tussen de verandering in S-BAIBA-concentratie in het plasma en de verandering in urine ($r=0,451$; $p=0,121$), wat verschillend is met de rustconditie waar er een trend tot significantie was (fig. 29).

Correlatie tussen de verandering in S-BAIBA-concentratie in plasma en in urine

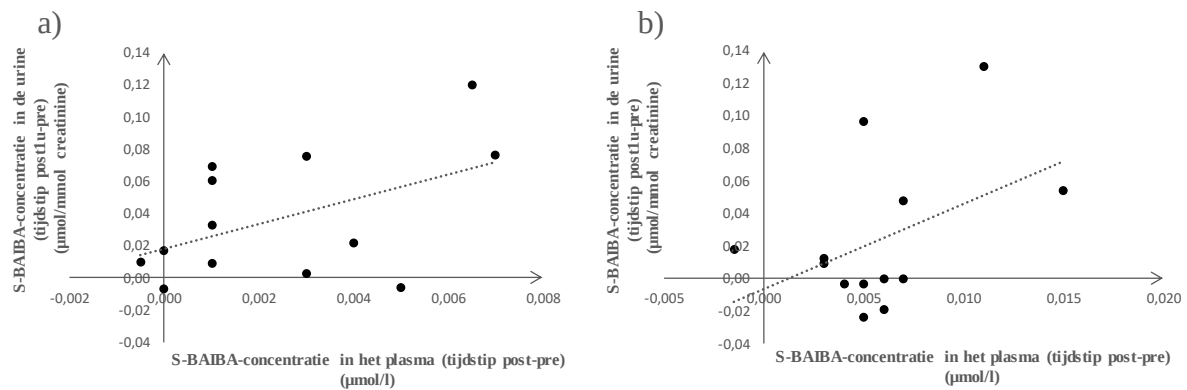


Fig. 29. De veranderingen in S-BAIBA-concentratie in het plasma en in urine tijdens (a) de rustconditie, waarbij een trend tot een significante positieve correlatie is en (b) tijdens een fysieke inspanning van één uur waar geen significante correlatie is. r^* ($p < 0,05$)

4. Discussie

De discussie wordt ingeleid door de resultaten van de BAIBA-concentraties op baseline te bespreken en nadien wordt het effect van een acute fysieke inspanning op de BAIBA-concentraties kritisch besproken om uiteindelijk een antwoord op de drie onderzoeksvragen te kunnen formuleren. Nadien worden de beperkingen van het onderzoek besproken alsook wat er in de toekomst nog onderzocht kan worden op basis van de bevindingen uit deze studie.

In het plasma bedraagt de gemiddelde BAIBA-concentratie 1,734 $\mu\text{mol/l}$, waarvan de R-BAIBA-isomeer 98% bepaalt met een gemiddelde concentratie van 1,705 $\mu\text{mol/l}$ en S-BAIBA slechts 2% met een gemiddelde concentratie van 0,028 $\mu\text{mol/l}$. Op basis van de literatuur werden geen verwachtingen geformuleerd aangezien er nog onenigheid was tussen de studies, waarbij Solem et al. (1974) beweren dat S-BAIBA dominant is in het plasma en tot vier keer meer voorkomt dan R-BAIBA en Fumitake et al. (1976) aangeeft dat R-BAIBA dominant is en 1,13 keer meer voorkomt dan S-BAIBA. Uit de resultaten van ons onderzoek blijkt dat R-BAIBA duidelijk dominant is en tot 50 keer meer voorkomt dan S-BAIBA op baseline. De reden voor de grote discrepantie ten opzichte van de andere studies is mogelijks dat de andere studies uit de jaren '70 dateren en de methodiek bijgevolg minder verfijnd was. De bevinding dat R-BAIBA veel meer voorkomt dan S-BAIBA brengt ons nieuwe informatie en duidt op een hogere thymine-afbraak in vergelijking met de valine-afbraak in rust. De afbraak van thymine kan hier mogelijks verklaard worden door het verbruik van energie aangezien ATP-consumptie leidt tot een opstapeling van UDP en UMP die op hun beurt de oxidatie van thymine kunnen bevorderen (Dudzinska et al., 2010). Daarnaast zien we in de resultaten een afname van de R-BAIBA-concentratie in rust van tijdstip pre naar tijdstip post, waarbij de proefpersonen één uur voor tijdstip pre gegeten hadden. De verhoogde concentratie van thymine door voedselinname (Gil, 2002) kan tot een verhoogde afbraak ervan leiden waardoor R-BAIBA in hogere concentratie aanwezig was na het ontbijt. Aangezien er geen resultaten zijn van de nuchtere bloedstalen, kan niet met zekerheid gezegd worden dat R-BAIBA ook in nuchtere toestand dominant is ten opzichte van S-BAIBA, maar de kleine verschuiving in het verloop van de verhouding van S-BAIBA op R-BAIBA wijst er eerder op dat R-BAIBA ook in nuchtere toestand dominant zal zijn.

In de literatuur wordt verder gesproken over kleine schommelingen in BAIBA-concentratie van dag tot dag (Crumpler et al., 1951 en Fink et al., 1952) terwijl er in dit onderzoek geen significant verschil in concentratie was op baseline tussen de verschillende testdagen. De proefpersonen hadden tijdens de testdagen een gestandaardiseerd ontbijt ingenomen en hadden de dag voordien geen vlees of vis geconsumeerd en geen zware inspanningen geleverd. De factoren voeding en inspanning werden met andere woorden uitgesloten, waardoor geen verschil in concentratie zichtbaar was. Ook in urine is R-BAIBA dominant en bepaalt die eveneens 98% van de totale BAIBA. We zien dus geen verschil in verhouding van S-BAIBA op R-BAIBA tussen plasma en urine.

Afhankelijk van het genotype bepaald door een SNP op rs37369 in het AGXT2-gen werden verschillende BAIBA-concentraties vastgesteld in het plasma. De proefpersonen met het genotype TT hadden hierbij een hogere R-BAIBA-concentratie dan de proefpersonen met het genotype CT en CC, wat te verwachten viel aangezien de mensen met het genotype TT een slechtere werking hebben van het AGXT2-enzym en daardoor R-BAIBA minder goed kunnen afbreken. In de literatuur werd dit fenomeen omschreven als Hyper-BAIBA-trait wat een autosomaal recessieve aandoening is (Kakimoto et al., 1969), waardoor het ook logisch is dat de proefpersonen met het genotype CT geen significant hogere R-BAIBA-concentratie hebben dan de proefpersonen met het genotype CC. Verder zagen we in de urine gelijkaardige resultaten als in de studies van Yoshino et al. (2014) en Suhre et al. (2011), waarbij er een significant verschil in R-BAIBA-concentratie is tussen de verschillende genotypen in de urine, maar door een tekort aan proefpersonen kon niet nagegaan worden tussen welke genotypes er een significant verschil is. Tussen de genotype-groepen werd geen verschil in S-BAIBA-concentratie gevonden in zowel het plasma als in de urine, wat ook te verwachten viel aangezien S-BAIBA niet door het AGXT2-enzym wordt afgebroken (fig. 2).

Als laatste werd afhankelijk van het geslacht enkel een verschil in de S-BAIBA-concentratie in het plasma gevonden waarbij de mannen gemiddeld een hogere concentratie hebben. De mannen hebben over het algemeen een grotere spiermassa dan de vrouwen (tabel 2) en een hogere spiermassa is gelinkt aan een hogere BAIBA-concentratie (Rietman et al., 2016). De hogere S-BAIBA-concentratie bij mannen kan dus verklaard worden door de hogere spiermassa bij mannen aangezien S-BAIBA in de spier aangemaakt wordt door valine-afbraak (Roberts et al. 2014). De reden waarom de R-BAIBA-concentratie niet verschillend is afhankelijk van het geslacht is waarschijnlijk omdat R-BAIBA niet beïnvloed wordt door de spiermassa.

De afbraakenzymen van thymine worden namelijk niet teruggevonden in de spieren (Van Kuilenburg et al., 2006) waardoor de afbraak van thymine die tot R-BAIBA leidt niet in de spieren gebeurt. Daarnaast komt ook het AGXT2-enzym dat instaat voor de afbraak van R-BAIBA amper voor in de spier (Blancquaert et al., 2016). Op basis van deze bevindingen verwachten we dat R-BAIBA niet in de spier wordt aangemaakt maar eerder in andere organen zoals de lever, waar de nodige afbraakenzymen wel aanwezig zijn (Van Kuilenburg et al., 2006).

Wat is nu het effect van een acute fysieke inspanning op de BAIBA-concentratie in de circulatie zoals gesteld in de hoofdvraag van dit onderzoek? Uit de resultaten komt voort dat de BAIBA-concentratie in het plasma stijgt tijdens een fysieke inspanning van één uur tegen een intensiteit van 40% Wmax, waardoor de hypothese die hierbij gesteld werd, aanvaard mag worden. Het onderzoek dat in vivo werd uitgevoerd bij mensen bevestigt wat Roberts et al. (2014) reeds in vitro bewezen hadden. De combinatie van de aanmaak van BAIBA onder invloed van een acute fysieke inspanning en de effecten die BAIBA uitoefent op de organen (Roberts et al., 2014) stelt ons ertoe in staat om BAIBA als een myokine te erkennen. Het recente onderzoek van Morales et al. (2017) verwierpt echter deze hypothese aangezien in het onderzoek geen significante stijging in BAIBA-concentratie gevonden werd na een fysieke inspanning van 350 kcal aan 70% VO₂max. In de studie zelf wordt aangegeven dat de reden hiervoor mogelijks kan zijn dat de proefpersonen ongetraind waren met een gemiddelde VO₂max van 41,8 ± 7,4 mL/kg/min, wat inderdaad veel lager ligt dan de gemiddelde VO₂max van 50,2 ± 10,2 mL/kg/min uit deze studie. In de literatuur is er enerzijds evidentie gevonden voor een verhoogde expressie van PGC-1α bij getrainde personen (Norheim et al., 2014; Russell et al., 2003; Winder et al., 2006) en aangezien PGC-1α tot een stijging in BAIBA-concentratie leidt (Roberts et al., 2014) (bijlage 2) wordt verwacht dat getrainde proefpersonen na een acute fysieke inspanning een hogere stijging in BAIBA-concentratie zullen hebben in vergelijking met ongetrainde proefpersonen. Ook bij getrainde ratten werd een hogere BCAA-afbraak vastgesteld (Shimomura et al., 2004) die de (S-)BAIBA-concentratie kan verhogen. Er zijn echter ook studies die eerder het tegengestelde aantonen, zoals de studie van Niess et al. (1996) waarbij getrainde proefpersonen een lagere DNA-afbraak hebben dan ongetrainde personen na een acute fysieke inspanning. Dit zou eerder wijzen op een lagere (R-)BAIBA-aanmaak. Op basis van bovenstaande bevindingen kan niet met zekerheid aangenomen worden dat getrainde personen een hogere BAIBA-aanmaak hebben na een acute fysieke inspanning, maar wij verwachten eerder van wel.

De totale BAIBA-concentratie waarover gesproken wordt, is de som van de twee enantiomeren R-BAIBA en S-BAIBA en aangezien beide op een andere manier worden aangemaakt (fig. 2), werd de vraag gesteld of ze ook allebei zouden toenemen in het plasma onder invloed van een acute fysieke inspanning. Aan de hand van de resultaten kan gesteld worden dat R-BAIBA toeneemt in concentratie onder invloed van een acute fysieke inspanning van één uur aan 40% Wmax, waarbij een procentuele stijging van 15% wordt vastgesteld. Na één uur fietsen is de R-BAIBA-concentratie in het plasma significant hoger dan in de rustconditie. De resultaten voldoen aan de verwachtingen aangezien er een stijging in R-BAIBA verwacht werd door een verhoogde pyrimidineoxidatie onder invloed van een inspanning (Tsai et al., 2001), hierdoor kan de hypothese aanvaard worden. Er werd ook aangetoond dat R-BAIBA hetzelfde verloop toont als de totale BAIBA, wat logisch is aangezien de totale BAIBA-concentratie voor ongeveer 98% uit R-BAIBA bestaat (fig. 23). De S-BAIBA-concentratie daarentegen bepaalt slechts 2% van de totale BAIBA-concentratie en toont ook een ander verloop dan de totale BAIBA. Onder invloed van de acute fysieke inspanning van één uur aan 40% Wmax steeg de S-BAIBA-concentratie significant ten opzichte van de rustconditie waarbij een procentuele stijging van 21% werd vastgesteld van tijdstip pre naar post. In tegenstelling tot de R-BAIBA-concentratie werd er na één uur fietsen geen hogere S-BAIBA-concentratie gevonden in vergelijking met de concentratie op tijdstip post in de rustconditie. De reden hiervoor is enerzijds dat de stijging van 21% gelijk is aan 0,006 µmol/l S-BAIBA wat miniem is en anderzijds dat de S-BAIBA-concentratie in de rustconditie iets hoger lag op tijdstip pre en eveneens stijgt, maar in mindere mate. De hypothese was dat S-BAIBA zou stijgen onder invloed van een acute fysieke inspanning, wat ook het geval is, maar aangezien de concentratie niet significant verschillend is van die in rust kan de hypothese niet aanvaard worden. Het gebrek aan een hogere concentratie kan verklaard worden doordat er geen stijging in BCAA-afbraak is bij een acute aerobe fysieke inspanning (Wagenmakers et al., 1991). Er kan echter wel een hogere S-BAIBA-concentratie verwacht worden bij een intensievere inspanning waarbij glycogeendepletie optreedt omdat de BCAA-afbraak dan hoger is (Wagenmakers et al., 1991). Meer evidentie hiervoor wordt teruggevonden in de studie van Roberts et al. (2014) waarbij PGC-1α, die normaal vrijkomt na spieractivatie, bij in vitro over-expressie in de spiercellen tot een stijging in BAIBA-concentratie leidt. Hierboven werd reeds aangehaald dat enkel S-BAIBA en niet R-BAIBA in de spieren zou aangemaakt worden, waardoor de stijging in BAIBA-concentratie in de spiercellen in de studie van Roberts et al. (2014) meer specifiek over een stijging in S-BAIBA-concentratie gaat. Op basis van deze studies verwachten we dat

S-BAIBA bij een andere, meer intensieve, acute fysieke inspanning een hogere stijging zal kennen en daardoor wel significant hoger zal liggen dan in rust.

In de studie van Roberts et al. (2014) werd de invloed van BAIBA op de metabole functies in het lichaam aangetoond en op basis van de resultaten uit ons onderzoek waarbij de R-BAIBA-concentratie significant toeneemt na een acute fysieke inspanning kan gesteld worden dat R-BAIBA een myokine is. Aangezien S-BAIBA amper toeneemt in absolute waarde na een acute fysieke inspanning kan deze niet als een myokine erkend worden. Bij een te lage BAIBA-concentratie is er namelijk geen stijging in de genen die instaan voor het bruinen van vet (fig. 32). We verwachten echter wel dat S-BAIBA zich als een myokine zou kunnen gedragen bij intensievere inspanningen waarbij glycogeendepletie optreedt, want dan is de valine-afbraak hoger (Wagenmakers et al., 1991). Er dient dus nog verder onderzoek gedaan te worden naar het effect van acute fysieke inspanningen op S-BAIBA. Daarnaast kunnen de metabole effecten niet met honderd procent zekerheid toegeschreven worden aan R-BAIBA waardoor verder onderzoek hiernaar gewenst is.

BAIBA stimuleert de expressie van bruinvet-specifieke genen in vetcellen

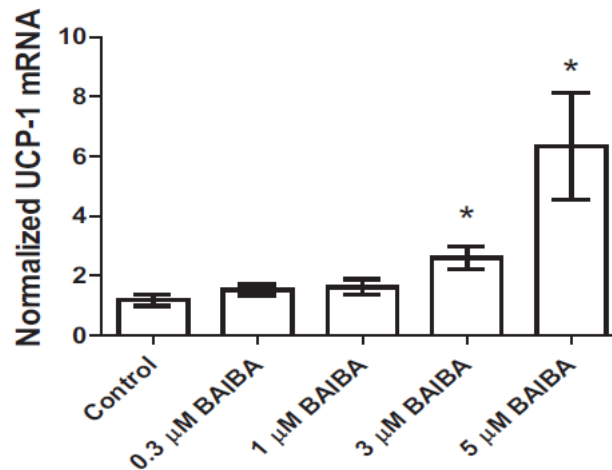


Fig. 30. In vitro toediening van BAIBA aan vetcellen stimuleert afhankelijk van de dosis de expressie van uncoupling protein-1 (UCP-1), een bruinvet-specifiek gen. * $p \leq 0,05$

Er werd in deze studie geen specifiek onderzoek naar gedaan, maar uit de resultaten kan wel voor een deel worden nagegaan wat er gebeurt met R-BAIBA en S-BAIBA tijdens en na de acute fysieke inspanning. Zo is de toegenomen R-BAIBA-concentratie reeds met 54% gedaald in de eerste 30 minuten na de acute fysieke inspanning in het plasma, maar is er in de urine één uur na het beëindigen van de inspanning geen toename in R-BAIBA-concentratie ten opzichte

van de rustconditie. Aangezien R-BAIBA afneemt in plasma en niet teruggevonden wordt in urine, wijst dit erop dat R-BAIBA niet uitgescheiden wordt door het lichaam, wat op zich wel logisch is als R-BAIBA metabole effecten uitoefent in het lichaam (Roberts et al., 2014). De veronderstelling die aan de hand van deze resultaten gemaakt wordt, is dat R-BAIBA getransporteerd wordt uit het plasma via de taurinetransporter. De taurinetransporter stijgt namelijk in concentratie bij chronische fysieke inspanningen (Roberts et al., 2014) en los daarvan werd reeds aangetoond dat de taurinetransporter BAIBA kan transporteren vanuit het plasma naar andere organen en omgekeerd (Bröer, 2008). Er werd hierbij niet aangetoond of dit over het transport van R-BAIBA of S-BAIBA ging, maar aangezien de totale BAIBA voornamelijk uit R-BAIBA bestaat op baseline, wordt er nu van uitgegaan dat hiermee het transport van R-BAIBA werd aangetoond. Wat er met R-BAIBA gebeurt na het transport ervan uit het plasma is niet zeker. R-BAIBA kan naar andere organen getransporteerd worden en daar afgebroken worden door het AGXT2-enzym, aangezien dit enzym stijgt na PGC-1 α overexpressie (Roberts et al., 2014) en op die manier kan R-BAIBA in de citroenzuurcyclus terecht komen. Het AGXT2-enzym is in verschillende organen werkzaam, waardoor we een ‘whole body degradation’ verwachten (Blancquaert et al., 2016). Aangezien het enzym voornamelijk in de lever en nier aanwezig is (Rodinov et al., 2014), zullen deze organen waarschijnlijk de grootste rol spelen in de afbraak van R-BAIBA. Anderzijds kan R-BAIBA naar het vetweefsel of de lever gebracht worden om daar de metabole functies te bevorderen, zoals het bruinen van vet en de hepatische β -oxidatie (Roberts et al., 2014). Hoe dit gebeurt en wat er nadien met R-BAIBA gebeurt werd eveneens niet onderzocht in deze studie waardoor hier geen uitspraken over gedaan kunnen worden. We verwachten dat er nog andere transporters en/of enzymen mee het metabolisme van R-BAIBA kunnen bepalen. Uit de resultaten van S-BAIBA daarentegen kan weinig opgemaakt worden over het mechanisme ervan aangezien de concentratie in het plasma na de inspanning blijft stijgen zonder daarbij een verschillende concentratie aan te nemen van de rustconditie. Zoals hierboven reeds aangegeven, wordt aangenomen dat de stijging van S-BAIBA in het plasma zo klein is dat ze niet als relevant kan beschouwd worden. In de urine zien we bijgevolg ook geen invloed van de inspanning op S-BAIBA. Van zowel R-BAIBA als S-BAIBA is onvoldoende wetenschappelijk bewijs beschikbaar over de mechanismen, waardoor verder onderzoek wenselijk is.

De resultaten die hierboven beschreven staan, zijn soms verschillend afhankelijk van het geslacht van de proefpersonen en worden daarom verder besproken. De R-BAIBA-concentratie bij mannen en vrouwen apart kent namelijk een verschillend verloop onder invloed van de

fysieke inspanning, waarbij de mannen een stijging vertonen, maar de vrouwen niet. De resultaten die hier besproken worden, moeten echter heel kritisch bekeken worden aangezien de resultaten van de vrouwen voortkomen uit de analyses van slechts 3 vrouwelijke proefpersonen met daarnaast nog eens elk een verschillend genotype dat in verband gebracht werd met de R-BAIBA-concentratie in het lichaam. Het laag aantal proefpersonen in combinatie met het genotype als storende factor maakt de resultaten minder valide en daardoor is het gebrek in stijging moeilijk toe te schrijven aan het geslacht. Als naar figuur 31 gekeken wordt waarop het R-BAIBA-verloop van de drie vrouwen wordt afgebeeld, zien we dat de R-BAIBA-concentraties lijken te stijgen net zoals bij de mannen, maar dat de rustwaarden van één proefpersoon atypisch zijn in vergelijking met de rustwaarden van de andere proefpersonen. Hoogstwaarschijnlijk is dit in combinatie met het laag aantal proefpersonen de reden waarom er bij de vrouwen geen significante stijging werd vastgesteld. Een hogere stijging in R-BAIBA bij de mannen door inspanning zou echter niet onlogisch zijn als het argument van ‘getraind versus ongetraind’ wordt gebruikt, zoals hierboven bij de bespreking van het totale BAIBA-verloop reeds aangehaald werd. De mannen zijn in deze studie met een gemiddelde $VO_2\text{max}$ van $52,55 \pm 9,70$ ml/kg/min namelijk meer getraind dan de vrouwen met een gemiddelde $VO_2\text{max}$ van $40,57 \pm 6,70$ ml/kg/min. In tegenstelling tot R-BAIBA werd bij S-BAIBA geen verschil in geslacht vastgesteld en stijgt de S-BAIBA-concentratie zowel bij de mannen als bij de vrouwen onder invloed van een acute fysieke inspanning. In principe zou hier opnieuw verwacht kunnen worden dat de minder getrainde vrouwen een lagere toename in S-BAIBA zouden hebben, aangezien de BCAA-afbraak die tot S-BAIBA leidt hoger is bij getrainde personen onder invloed van aerobe fysieke inspanningen (Shimomura et al., 2004), maar dit is niet het geval. S-BAIBA wordt namelijk in de spieren aangemaakt en de mannen hebben gemiddeld gezien een grotere spiermassa. Aangezien de S-BAIBA-concentratie na de aerobe acute fysieke inspanning amper verschilt van de rustconditie is het misschien niet zinvol om een vergelijking te maken afhankelijk van het geslacht. Op basis van deze bevindingen wordt gespeculeerd dat niet zozeer het geslacht een invloed heeft op het R-BAIBA- en S-BAIBA-verloop na een acute fysieke inspanning, maar dat de spiermassa en de mate waarin de personen getraind zijn een bepalende factor kunnen zijn. Aan de hand van deze resultaten is het echter niet mogelijk om conclusies te trekken over het R-BAIBA- en S-BAIBA-verloop bij vrouwen na een acute fysieke inspanning en wordt vastgesteld dat er verder onderzoek nodig is waarbij meer vrouwelijke proefpersonen getest worden en waarbij de spiermassa en de $VO_2\text{max}$ in rekening gebracht worden.

BAIBA-concentratie van de drie vrouwelijke proefpersonen

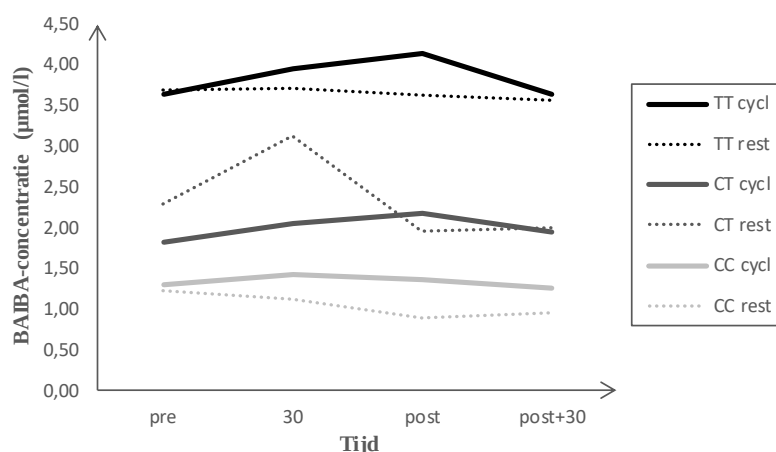


Fig. 31. BAIBA-concentratie van de drie vrouwelijke proefpersonen, waarbij de rustconcentratie van de CT proefpersoon een atypisch verloop toont.

Naast het geslacht is er nog een andere factor die een invloed heeft op de BAIBA-concentraties en meer specifiek op de R-BAIBA-concentraties, namelijk het genotype bepaald door een SNP op rs37369 in het AGXT2-gen. Aangezien de mate waarin R-BAIBA afgebroken wordt verschillend is tussen de genotypen op baseline werd voorafgaand aan het onderzoek de vraag gesteld of er ook een verschillend verloop zou zijn in R-BAIBA-concentraties tussen de verschillende genotypen onder invloed van een fysieke inspanning. De resultaten geven aan dat er geen significant verschil in R-BAIBA-verloop is tussen de genotypen, waardoor de hypothese die stelde dat de R-BAIBA-concentratie meer gestegen zou zijn in de TT-groep niet aanvaard kan worden. Op zich werd wel een even grote aanmaak van R-BAIBA verwacht onder invloed van een fysieke inspanning aangezien het mechanisme hiervan bij de verschillende groepen dezelfde is, maar het verloop in het plasma werd anders verwacht door de verschillende afbraak van R-BAIBA afhankelijk van het genotype. Er werd met andere woorden verwacht dat R-BAIBA in de CC- en CT-groep voor een deel zou afgebroken worden tijdens de inspanning door het AGXT2-enzym en in de TT-groep niet door de slechte werking van het AGXT2-enzym, met als gevolg dat de R-BAIBA-concentratie een grotere stijging zou vertonen in de TT-groep dan in de CT- en CC-groep. Als naar figuur 32 gekeken wordt, dan kan een gelijkaardig resultaat waargenomen worden, maar zonder dat er significante verschillen worden vastgesteld. Er dient hierbij rekening gehouden te worden met het feit dat de groepen een laag aantal proefpersonen telde, met 3 proefpersonen in de TT-groep, 5 in de CT-groep en 7 in de

CC-groep, waardoor het moeilijker is om een verschil aan te tonen. Anderzijds wijst dit op het kleine aandeel van het AGXT2-enzym in het mechanisme van R-BAIBA onder invloed van een fysieke inspanning. Meer evidentie hiervoor is te vinden in de resultaten van de urine, waar eveneens geen verschil in R-BAIBA-verloop gevonden werd tussen de verschillende genotypen en waarbij ze allemaal geen significante stijging hebben ten opzichte van de rustconditie. Dat de toegenomen R-BAIBA onder invloed van een fysieke inspanning niet doorstroomt naar de urine werd hierboven reeds vastgesteld, maar aangezien de TT-groep R-BAIBA niet kan afbreken via het AGXT2-enzym, wijst dit mogelijks op een andere metabole weg van R-BAIBA of opslag ervan. Bij deze wordt ook aangenomen dat het AGXT2-enzym bij een acute fysieke inspanning slechts een kleine rol speelt in het mechanisme van R-BAIBA in tegenstelling tot de rol die het speelt in rust. De mogelijkheid om R-BAIBA te transporteren in combinatie met de kleine rol van het AGXT2-enzym wijst opnieuw op een ‘whole body degradation’. Op zich is het vrij logisch dat R-BAIBA niet volledig wordt afgebroken door het AGXT2-enzym om in de citroenzuurcyclus terecht te komen na een acute fysieke inspanning aangezien in de studie van Roberts et al. (2014) werd aangetoond dat verhoogde BAIBA-concentraties de metabole functies in het lichaam zoals de hepatische β -oxidatie en het bruinen van wit vet kunnen stimuleren.

Δ R-BAIBA-verloop (fietsconditie - rustconditie) per rs37369 genotype

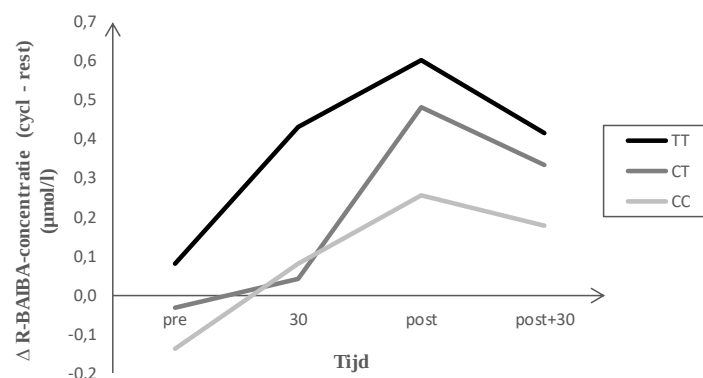


Fig. 32. Het verschil in R-BAIBA-verloop tussen fiets- en rustconditie weergegeven per rs37369 genotype. De toename in concentratie die kan toegeschreven worden aan de inspanning is bij de TT-groep zichtbaar hoger dan bij de CT- en de CC-groep.

Voor S-BAIBA werd ook nagegaan of er een verschillend verloop zou zijn afhankelijk van het genotype onder invloed van een fysieke inspanning, aangezien een verschillend verloop een indicatie zou kunnen zijn voor de overgang tussen R-BAIBA en S-BAIBA.

De resultaten geven geen significant verschil aan tussen de genotypen, wat volgens de verwachtingen is aangezien het verschil in genotype geen directe invloed heeft op de S-BAIBA-concentratie in het plasma (fig. 2). Daarnaast wijst dit er eerder op dat er geen tot een heel lage overgang is tussen R-BAIBA en S-BAIBA in het plasma.

Aangezien de genotype-groepen beperkt waren in aantal proefpersonen, is de validiteit van bovenstaande resultaten eerder beperkt en is het moeilijk om er conclusies uit te trekken. Om een accurater beeld te krijgen van de invloed van een fysieke activiteit op de R-BAIBA-concentratie bij de verschillende genotypen is het nodig om verder onderzoek uit te voeren met meer proefpersonen per genotype.

4.1. BEPERKINGEN IN HET ONDERZOEK

De sample size van 15 proefpersonen werd voorafgaand aan de verwerking van de bloed- en urinestalen bepaald op basis van de analyses die uitgevoerd gingen worden op alle proefpersonen samen, zonder een onderscheid te maken tussen geslacht en genotype. Bijgevolg waren er met 3 vrouwelijke proefpersonen, te weinig gegevens om met de analyses apart voor de vrouwen valide resultaten te bekomen en was het moeilijk om daaruit conclusies te kunnen trekken. Hetzelfde geldt voor de groepen die gevormd werden op basis van het genotype, waarbij de CC-groep uit 7 proefpersonen bestond, de CT-groep uit 5 en de TT-groep uit slechts 3 proefpersonen. Bij de urinesamples ontbraken sommige data waardoor het aantal proefpersonen dat werd opgenomen in de analyses verminderd werd van 15 naar 12, wat opnieuw de validiteit in het gedrang bracht. Naar de toekomst toe zal er dus beter met een grotere sample size gewerkt worden, waarbij rekening gehouden wordt met de verschillende subgroepen.

Om de baseline-waarden te bepalen werd in het onderzoek gebruik gemaakt van de gegevens op de premeting tijdens de fietsconditie, maar voorafgaand aan die meting hadden de proefpersonen reeds een ontbijt genuttigd waardoor de waarden niet volledig als baseline beschouwd kunnen worden. Zoals in de methode beschreven, werden er wel nuchtere bloed- en urinestalen afgenomen op de testdagen, maar deze werden niet verder verwerkt waardoor de BAIBA-concentraties hiervan ook niet gekend waren. Aangezien er nog weinig accurate info te vinden is over de BAIBA-concentraties in het plasma en in de urine en er onenigheid is tussen de studies waarin deze info wel is terug te vinden, was het beter geweest, mochten de nuchtere stalen verwerkt geweest zijn om de baselinewaarden daarop te kunnen baseren.

4.2. VERDER ONDERZOEK

Dit onderzoek leverde reeds duidelijke resultaten op, maar door een tekort aan proefpersonen in sommige analyses kon niet altijd een valide conclusie getrokken worden. Uit de bevindingen komen volgende vragen voort: ‘Stijgt R-BAIBA onder invloed van een acute fysieke inspanning in het plasma bij vrouwen?’ en ‘Is het R-BAIBA-verloop in zowel plasma als in urine onder invloed van een acute fysieke inspanning verschillend afhankelijk van het genotype bepaald door een SNP op rs37369?’. Beide vragen kunnen eenvoudigweg onderzocht worden door hetzelfde onderzoeksprotocol te hanteren, maar met meer vrouwen en met meer proefpersonen per genotype-groep, zodat de power en de validiteit van de resultaten stijgt.

Met dit onderzoek werd aangetoond dat BAIBA een significante stijging vertoont onder invloed van een aerobe fysieke inspanning en in het onderzoek van Roberts et al. (2014) werd bewezen dat BAIBA een effect heeft op het metabolisme in het lichaam, waardoor we kunnen stellen dat BAIBA een myokine is. Aangezien de totale BAIBA-concentratie voor $\pm 98\%$ uit R-BAIBA bestaat en het verloop onder invloed van een acute fysieke inspanning dezelfde is, wordt aangenomen dat R-BAIBA een myokine is en aldus de effecten op het metabolisme verzorgt, maar dit werd nog niet wetenschappelijk aangetoond. De vraag is dus of R-BAIBA hepatische β -oxidatie en het bruinen van wit vet kan bevorderen. Dit kan via gelijkaardige in-vitro-testen als in de studie van Roberts et al. (2014) achterhaald worden. Hierbij kan ook meteen hetzelfde onderzocht worden voor S-BAIBA om na te gaan of S-BAIBA eventueel ook een myokine is.

Aangezien de BCAA-afbraak hoger is bij inspanningen met glycogendepletie (Wagenmakers et al., 1991) en de pyrimidine-afbraak hoger is bij hoog intensieve aerobe inspanningen (Tsai et al., 2001) verwachten we een hogere S-BAIBA- en R-BAIBA-aanmaak bij hoog intensieve inspanningen in vergelijking met de licht intensieve aerobe inspanning uit dit onderzoek. Het is bijgevolg nodig om de intensiteit en de duur van de acute fysieke inspanning in het testprotocol aan te passen en opnieuw het effect ervan op R-BAIBA en S-BAIBA na te gaan.

In de discussie wordt aangegeven dat de toegenomen R-BAIBA-concentratie in het plasma na een acute fysieke inspanning voornamelijk getransporteerd wordt naar andere organen door onder andere de taurinetransporter, maar hiervan is geen direct bewijs. Daarnaast is er nog de vraag wat er met R-BAIBA gebeurt nadat het getransporteerd wordt naar de organen. In hoeverre wordt R-BAIBA afgebroken door het AGXT2-enzym? Is er nog een ander enzym dat R-BAIBA kan afbreken? Is er opslag van R-BAIBA mogelijk?

Over het algemeen is er dus verder onderzoek nodig naar het mechanisme van R-BAIBA onder invloed van een acute fysieke inspanning.

Op basis van de weinige info die beschikbaar is, werd er nu vanuit gegaan dat S-BAIBA voornamelijk in de spier wordt aangemaakt en dat R-BAIBA niet in de spier kan aangemaakt worden en eerder in de lever wordt geproduceerd. Er is hiervoor geen direct bewijs waardoor het wenselijk is om dit verder te onderzoeken zodat een beter inzicht verworven kan worden in het metabolisme van R- en S-BAIBA.

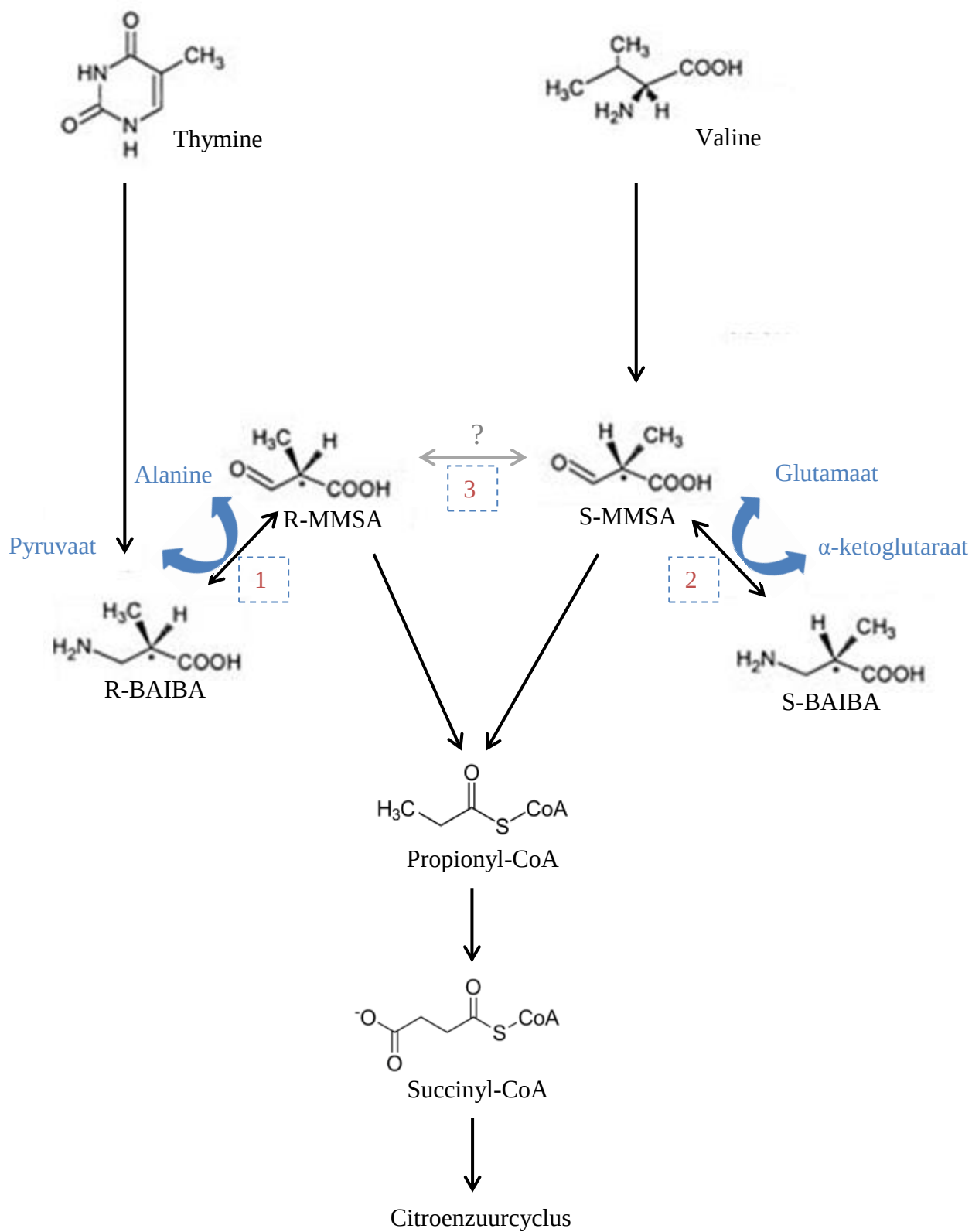
5. Conclusie

In het onderzoek werd bewezen dat BAIBA stijgt in het plasma na een acute fysieke inspanning en in combinatie met de bevindingen van Roberts et al. (2014) dat BAIBA metabole effecten uitoefent in het lichaam, kan gesteld worden dat BAIBA een myokine is. Aangezien de totale BAIBA-concentratie bestaat uit ongeveer 98% R-BAIBA en de enantiomeer eenzelfde verloop toont onder invloed van een acute fysieke inspanning wordt aangenomen dat de metabole effecten beschreven in de studie van Roberts et al. (2014) kunnen toegeschreven worden aan R-BAIBA, waardoor meer specifiek besloten kan worden dat de enantiomeer R-BAIBA een myokine is. Thymine als precursor van R-BAIBA speelt bijgevolg ook een belangrijke rol in het myokine-verhaal. De S-BAIBA-enantiomeer kan echter niet als een myokine erkend worden op basis van deze studie, maar verder onderzoek is nodig aangezien er evidentie is voor een hogere S-BAIBA-aanmaak bij andere inspanningsintensiteiten.

Als laatste werd aangetoond dat het genotype bepaald door een SNP op rs37369 de R-BAIBA-concentratie op baseline sterk beïnvloedt door de verschillende werking van het AGXT2-enzym, maar dat het weinig tot geen invloed heeft op de R-BAIBA-concentratie bij een acute fysieke inspanning. Hiermee wordt aangetoond dat het AGXT2-enzym een minder significante rol speelt in het R-BAIBA-mechanisme na een acute fysieke inspanning dan in rust.

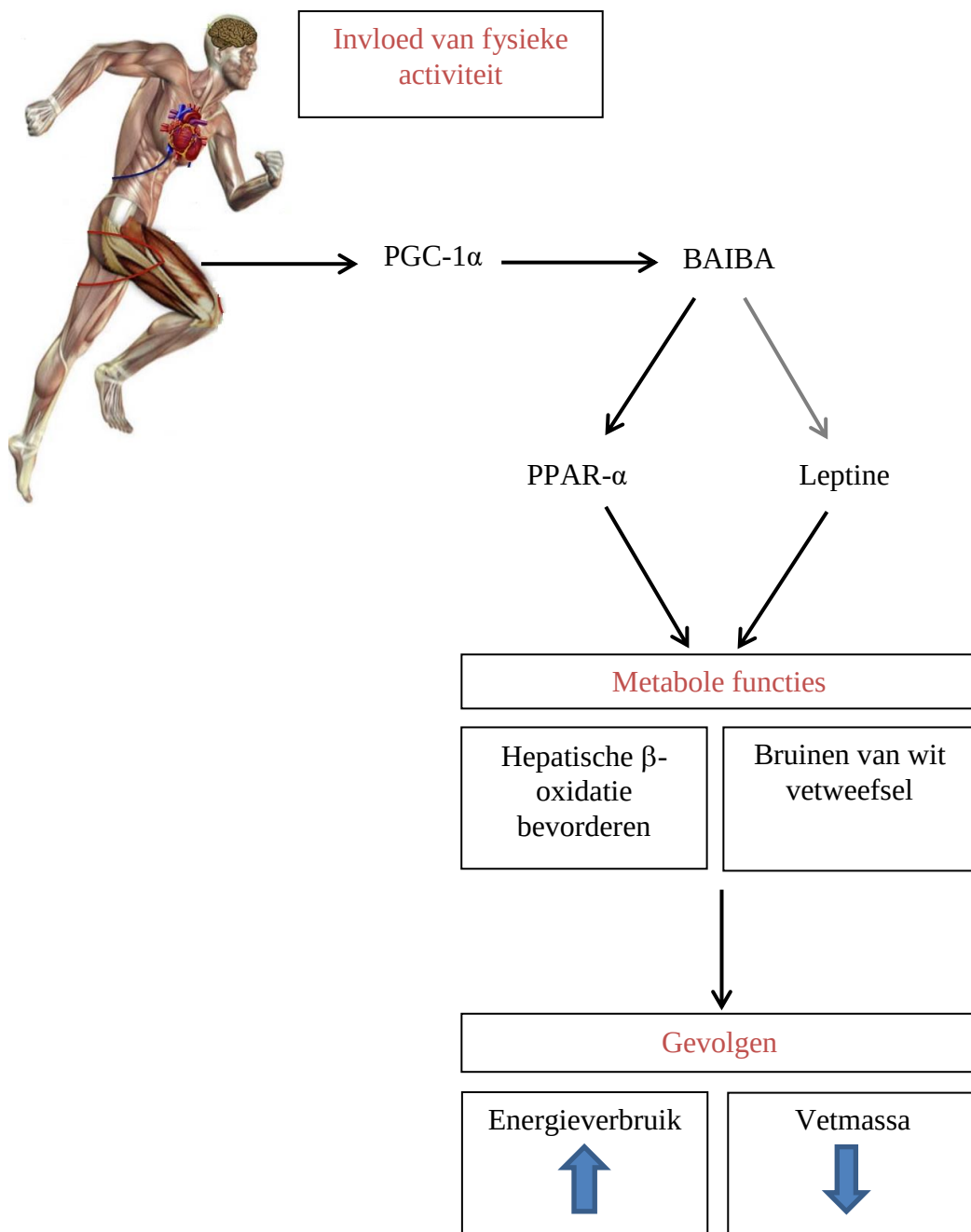
Bijlage

Overkoepelende figuur met de metabole wegen van thymine en valine



Bijlage 1. Metabole wegen van thymine en valine waarbij R-BAIBA en S-BAIBA respectievelijk gevormd worden en via R-MMSA en S-MMSA tot in de citroenzuurcyclus leiden. 1) Transaminasereactie van R-BAIBA met pyruvaat door het AGXT2-enzym die tot R-MMSA en alanine leidt. 2) Transaminasereactie van S-BAIBA met α -ketoglutaraat door het ABAT-enzym die tot S-MMSA en glutamaat leidt. 3) de vraag of de reactie van R-MMSA naar S-MMSA en/of omgekeerd mogelijk is en op welke manier dat dan gebeurt. (naar van Kuilenburg et al., 2004; Marcadier et al., 2013 en Van Gennip et al., 1981).

De voornaamste functies van BAIBA en de invloed van FA hierop



Bijlage 2. De invloed van fysieke activiteit op BAIBA via de vrijstelling van PGC-1 α in actieve spiercellen en de voornaamste functies die hiermee gepaard gaan. BAIBA beïnvloedt het metabolisme via activatie van PPAR- α en mogelijk ook via leptine. De algemene gevolgen hiervan zijn een verhoogd energieverbruik en een gedaalde vetmassa. Bijkomende gevolgen zijn in de literatuurstudie terug te vinden (naar Sanchez-Delgado et al., 2015).

Qiagen DNA-isolatie methode

Startvolume van $\pm 500\mu\text{L}$

Voorverwarmen van waterbad (falcon)/shaker (epp) 37°C

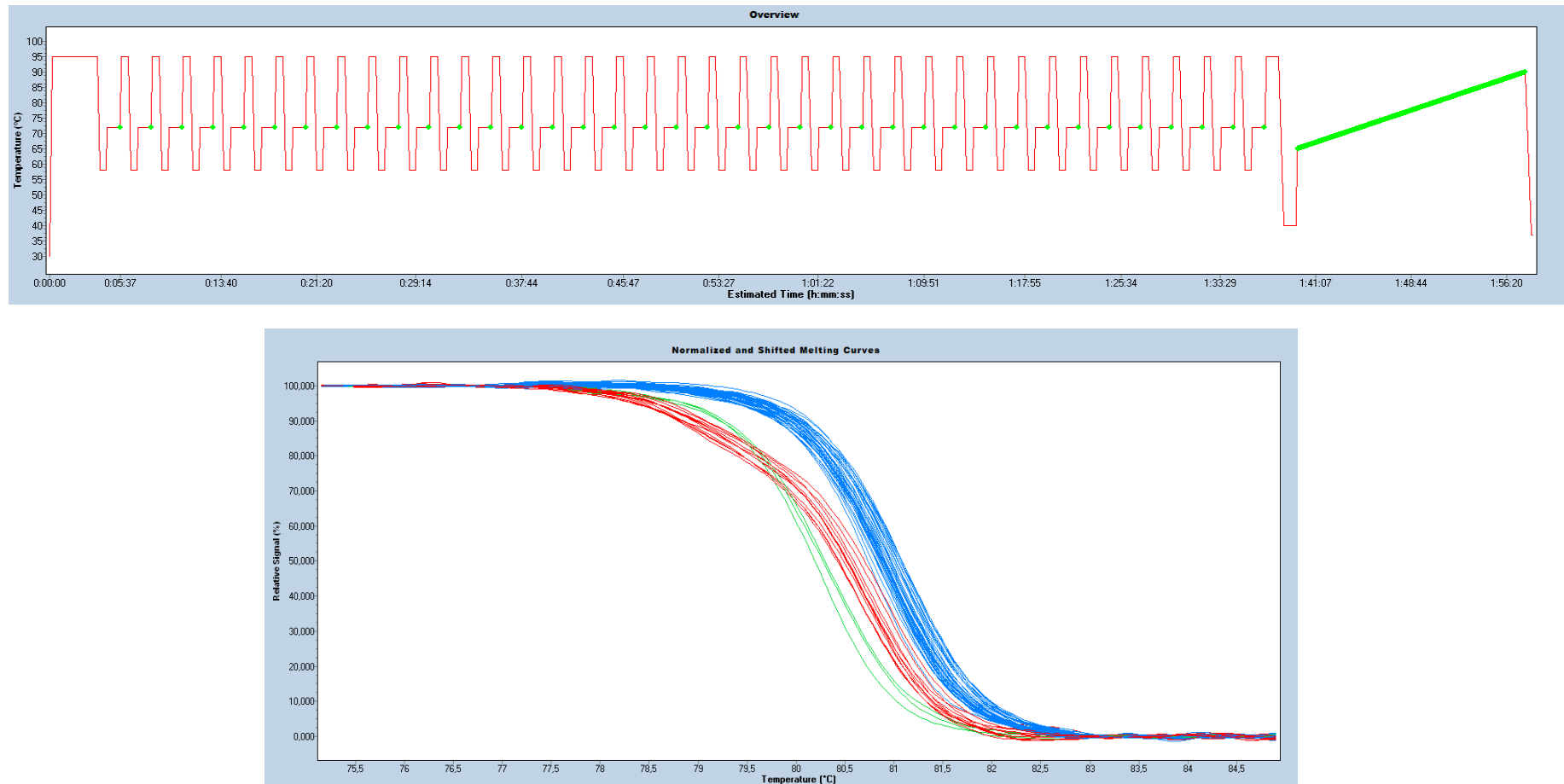
1. Start volume + 3 X RBC lysis solution in ml
2. Incubatie gedurende 10' (kamertemperatuur) en enkele keren omkeren
3. Centrifuge
 - a. 1min – max snelheid epp
 - b. 10' – 3500 t/min falcon
4. Pipetteren van supernatans
 - a. $10\mu\text{L}$ startvolume houden
 - b. Behouden van ($\pm 1/3$ startvolume ($100\text{-}400\mu\text{L}$ startvolume))
5. vortex pellet
6. voeg 1 volume cell lysis solution toe
7. vortex 10'' (medium snelheid)
8. incuberen 37°C gedurende 2uur

Voorverwarmen van waterbad (falcon)/shaker (epp) 65°C

9. afkoelen tot kamertemperatuur
10. $1/3$ startvolume van protein precipitation solution toevoegen
11. 20'' vortex (max snelheid)
12. Centrifuge
 - a. 2' – max snelheid epp
 - b. 10' – 3500 rpm falcon
13. voeg supernatans toe nieuwe epp vullen met 1 startvolume 2-propanol
14. 50 keer omkeren (tot DNA zichtbaar is)
15. Centrifuge
 - a. 1min – max snelheid epp
 - b. 3' – 3500 rpm falcon
16. voorzichtig supernatans verwijderen
17. voeg 1 keer startvolume 70% EtOH toe en 25 keer omkeren
18. Centrifuge
 - a. 1min – max snelheid epp
 - b. 3' – 3500 rpm falcon
19. Alcohol drogen gedurende 20 min
20. Voeg DNA hydration solution toe
21. Vortex 5'' aan medium snelheid
22. Incuberen aan 65°C voor 1uur
23. Incuberen op kamertemperatuur gedurende gedurende een nacht (500rpm)

Bijlage 3. DNA-isolatie uit de bloedsamples aan de hand van het Qiagen DNA-isolation protocol

PCR en HRM uitkomst



Bijlage 4. (a) het protocol dat werd toegepast in het PCR-apparaat en (b) de uitkomst uit de High Resolution Melting, waarbij de blauwe lijnen de proefpersonen met het CC genotype zijn, de rode lijnen de proefpersonen met het genotype CT en de groene lijnen de proefpersonen met het genotype TT.

Referenties

- Armstrong A.D., Yates K., Kakimoto Y., Taxiguchi K., Kappe T. (1963). Excretion of p-Aminoisobutyric Acid by Man. *The Journal of Biological Chemistry*. 238 (4).
- Bartlett K., Eaton S. (2004). Mitochondrial β -oxidation. *Eur. J. Biochem*. 271, 462–469
- Bjorbaek C., Kahn B.B. (2004). Leptin signalling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog. Horm. Res.* 59, 305–331.
- Begrache K., Massart J., Fromenty B. (2010). Effects of β -aminoisobutyric acid on leptin production and lipid homeostasis: mechanisms and possible relevance for the prevention of obesity. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 24(3), 269-82.
- Berger J., Moller D.E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53, 409-35.
- Berry H.K. (1960). Individual metabolic patterns: II. Excretion of beta-aminoisobutyric acid. *Metabolism, Clin. and Exptl.* 9, 373-6.
- Blancquaert L., Baba S.P., Kwiatkowski S., Stautemas J., Stegen S., Barbaresi S., Chung W., Boakye A.A., Hoetker J.D., Bhatnagar A., Delanghe J., Vanheel B., Veiga-da-Cunha M., Derave W., Everaert I. (2016). Carnosine and anserine homeostasis in skeletal muscle and heart is controlled by β -alanine transamination. *J. Physiol.* 594(17):4849-63.
- Boden G. (2003). Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. 111(3), 121-4.
- Borek E., Sharma O.K., Buschman F.L., Cohn D.L., Penley K.A., Judson F.N., Dobozin B.S., Horsburgh C.R. Jr., Kirkpatrick C.H. (1986). Altered excretion of modified nucleosides and beta-aminoisobutyric acid in subjects with acquired immunodeficiency syndrome or at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Cancer Res.* 46(5), 2557-61.
- Boström P., Wu J., Jedrychowski M.P., Korde A., Ye L., Lo J.C., Rasbach K.A., Boström E.A., Choi J.H., Long J.Z., et al. (2012). A PGC1- α -dependent myokine that drives browning of white fat and thermogenesis. *Nature*. 481, 463–468.
- Briviba K., Watzl B., Nickel K., Kulling S., Bös K., Haertel S., Rechkemmer G., Bub A. (2005). A half-marathon and a marathon run induce oxidative DNA damage, reduce antioxidant capacity to protect DNA against damage and modify immune function in hobby runners. *Redox Rep.* 10(6):325-31.
- Bröer S. (2008). Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol. Rev.* 88(1):249-86.
- Cannon B., Nedergaard J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* 84, 277–359.

Cao L., Choi E.Y., Liu X., Martin A., Wang C., Xu X., During M.J. (2011). White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metab.* 14, 324–338.

Cartler S.M. (1956). A family study of urinary β -aminoisobutyric acid excretion. *Am. J. Human Genet.* 8, 120.

Commings S.P., Watson P.M., Frampton I.C., Gettys T.W. (2001). Leptin selectively reduces white adipose tissue in mice via a UCP1-dependent mechanism in brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280(2), E372-7.

Congdon P.J., Haigh D., Smith R., Green A., Pollitt R.J. (1981) Hypermethioninaemia and 3-hydroxyisobutyric aciduria in an apparently healthy baby. *J. Inherit Metab. Dis.* 4(2), 79-80.

Crumpler H.R., Dent C.E., Harris H., Westall R.G. (1951). Beta-Aminoisobutyric acid (alpha-methyl-beta-alanine); a new amino-acid obtained from human urine. *Nature.* 167.

Davison G.W. (2016). Exercise and Oxidative Damage in Nucleoid DNA Quantified Using Single Cell Gel Electrophoresis: Present and Future Application. *Front Physiol.* 7:249.

Dudzinska W., Lubkowska A., Dolegowska B., Safranow K. (2010). Blood uridine concentration may be an indicator of the degradation of pyrimidine nucleotides during physical exercise with increasing intensity. *J. Physiol. Biochem.* 66(3):189-96.

Eaton S. (2002). Control of mitochondrial β -oxidation flux. *Prog. Lipid. Res.* 41, 197–239.

Enkhjargal Ts. en Tserennadmid Ch. (2004). Urinary excretion of beta-aminoisobutyric acid in hematological diseases. *Rinsho Byori.* 52(1), 17-21.

Erol E., Kumar L.S., Cline G.W., Shulman G.I., Kelly D.P., Binas B. (2004). Liver fatty acid binding protein is required for high rates of hepatic fatty acid oxidation but not for the action of PPAR α in fasting mice. *FASEB J.* 18, 347–349.

Fink K. (1951). A substance occasionally found as a major ninhydrin-reacting component of urine. *Proc Soc Exp Biol Med.* 76(4), 692-5.

Fink K., Henderson R.B., Fink R.M. (1952). Beta-aminoisobutyric acid in rat urine following administration of pyrimidines. *J. Biol. Chem.* 197, 441.

Fogarty M.C., Hughes C.M., Burke G., Brown J.C., Trinick T.R., Duly E., Bailey D.M., Davison G.W. (2011). Exercise-induced lipid peroxidation: Implications for deoxyribonucleic acid damage and systemic free radical generation. *Environ Mol Mutagen.* 52(1):35-42.

Fromenty B., Pessayre D. (1995). Inhibition of mitochondrial β -oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 67(1), 101-54.

Fumitake G., Yasutami K., Tokuji I. (1976). Identification of β -aminoisobutyric acid in uremic serum. *Clin. Chim. Acta.* 70: 407-415.

Garn S.M. (1961). *Human Races*. Springfield IL. Thomas C.C.

- Gil A. (2002). Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 Suppl 3:S1-4.
- Ginter E., Simko V. (2012). Brown fat tissue - a potential target to combat obesity. *Bratisl Lek Listy.* 113(1), 52-6.
- Ginter E., Simko V. (2014). Recent data on obesity research: β -aminoisobutyric acid. *Bratisl Lek Listy.* 115 (8), 492 – 493.
- Gulick T., Cresci S., Caira T., Moore D.D., Kelly D.P. (1994). The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91(23), 11012-6.
- Harper A.E., Miller R.H., en Block K.P. (1984). Branched-chain amino acid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 4, 409–454.
- Harris H. (1953). Family studies on the urinary excretion of β -aminoisobutyric acid. *Ann. Eugen.* 18: 43-49.
- Hatazawa Y., Tadaishi M., Nagaike Y., Morita A., Ogawa Y., Ezaki O., Takai-Igarashi T., Kitaura Y., Shimomura Y., Kamei Y., Miura S. (2014). PGC-1 α -mediated branched-chain amino acid metabolism in the skeletal muscle. *PLoS. One.* 9(3):e91006.
- Houten S.M., Wanders R.J.A. (2010). A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33, 469–477.
- Jung T.W., Hwang H., Hong H.C., Yoo H.J., Baik S.H., Choi K.M. (2015). BAIBA attenuates insulin resistance and inflammation induced by palmitate or a high fat diet via an AMPK–PPAR δ -dependent pathway in mice. *Diabetologia.* 58, 2096–2105.
- Kakimoto Y., Taniguchi K., Sano I. (1969). D-beta-aminoisobutyrate:pyruvate aminotransferase in mammalian liver and excretion of beta-aminoisobutyrate by man. *J. Biol. Chem.* 244(2), 335-40.
- Khodabandehloo H, Gorgani-Firuzjaee S1, Panahi G1, Meshkani R2. (2016). Molecular and cellular mechanisms linking inflammation to insulin resistance and β -cell dysfunction. *Transl. Res.* 167(1), 228-56.
- Kittel A., Müller F., König J., Mieth M., Sticht H., Zolk O., Kralj A., Heinrich M.R., Fromm M.F., Maas R. (2014). Alanine-glyoxylate aminotransferase (AGXT2) polymorphisms have considerable impact on methylarginine and β -aminoisobutyrate metabolism in healthy volunteers. *PLoS One.* 9(2), e88544.
- Knowler W.C., Barrett-Connor E., Fowler S.E., Hamman R.F., Lachin J.M., Walker E.A., Nathan D.M. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 346(6), 393-403.
- Kontani Y., Kaneko M., Kikugawa M., Fujimoto S., Tamaki N. (1993). Identity of D-3-aminoisobutyrate-pyruvate aminotransferase with alanine-glyoxylate aminotransferase 2. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1156, 161-166.

- Kupieccki F.P., Coon M.J. (1957). The enzymatic synthesis of β -aminoisobutyrate. A product of valine metabolism, and of β -alanine, a product of β -hydroxy-propionate metabolism. *J. Biol. Chem.* 229(2), 743-54.
- Leskinen T., Rinnankoski-Tuikka R., Rintala M., Seppänen-Laakso T., Pöllänen E., Alen M., Sipilä S., Kaprio J., Kovanen V., Rahkila P., Oresic M., Kainulainen H., Kujala U.M. (2010). Differences in muscle and adipose tissue gene expression and cardio-metabolic risk factors in the members of physical activity discordant twin pairs. *PLoS One*. 5(9).
- Liang H. en Ward W.F. (2006). PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv. Physiol. Educ.* 30, 145–151.
- Lin J., Wu H., Tarr P.T., Zhang C.Y., Wu Z., Boss O., Michael L.F., Puigserver P., Isotani E., Olson E.N., et al. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 418, 797–801.
- Marcadier J.L., Smith A.M., Pohl D., Schwartzentruber J., Al-Dirbashi O.Y. et al. (2013). Mutations in *ALDH6A1* encoding methylmalonate semialdehyde dehydrogenase are associated with dysmyelination and transient methylmalonic aciduria. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 8, 98.
- Michael L.F., Wu Z.D., Cheatham R.B., Puigserver P., Adelmant G., Lehman J.J., Kelly D.P., and Spiegelman B.M. (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, 3820–3825.
- Molfino A., Amabile M.I., Ammann T., Farcomeni A., Lionetto L., Simmaco M., Lai S., Laviano A., Rossi Fanelli F., Chiappini M.G., Muscaritoli M. (2017). The metabolite beta-aminoisobutyric acid and physical inactivity among hemodialysis patients. *Nutrition*.
- Morales F.E., Forse J.S., Andre T.L., McKinley-Barnard S.K., Hwang P.S., Anthony I.G., Tinsley G.M., Spillane M., Grandjean P.W., Ramirez A., Willoughby D.S. (2017). BAIBA Does Not Regulate UCP-3 Expression in Human Skeletal Muscle as a Response to Aerobic Exercise. *J. Am. Coll. Nutr.* 36(3):200-209
- Nicklas TA, O'Neil CE. (2013). Prevalence of Obesity: A public health problem poorly understood. *FAO Departments*, 24.
- Niess A.M., Hartmann A., Grünert-Fuchs M., Poch B., Speit G. (1996). DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int. J. Sports Med.* 17(6):397-403.
- Nogalska A., Sucajtys-Szulc E., Swierczynski J. (2005). Leptin decreases lipogenic enzyme gene expression through modification of SREBP-1c gene expression in white adipose tissue of aging rats. *Metabolism*. 54(8), 1041-7.
- Norheim F., Langleite T.M., Hjorth M., Holen T., Kielland A., Stadheim H.K., Gulseth H.L., Birkeland K.I., Jensen J., Drevon C.A. (2014). The effects of acute and chronic exercise on PGC-1 α , irisin and browning of subcutaneous adipose tissue in humans. *FEBS J.* 281(3):739-49.

Note R., Maisonneuve C., Letteron P., et al. (2003). Mitochondrial and metabolic effects of nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) in mice receiving one of five single- and three-dual-NRTI treatments. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3384–3392.

Oh K.S., Kim M., Lee J., Kim M.J., Nam Y.S., Ham J.E., Shin S.S., Lee C.M., Yoon M. (2006). Liver PPAR α and UCP2 are involved in the regulation of obesity and lipid metabolism by swim training in genetically obese db/db mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 1232–1239.

Park A., Kim W.K., Bae K. (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 6(1), 33–42.

Pedersen B.K. (2009). Edward F. Adolph Distinguished Lecture: Muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines. *J. Appl. Physiol.* 107, 1006–1014.

Pedersen B.K. en Febbraio M.A. (2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev.* 88(4), 1379–406.

Puigserver P., Adelmant G., Wu Z.D., Fan M., Xu J.M., O'Malley B., Spiegelman B.M. (1999). Activation of PPAR- γ coactivator-1 through transcription factor docking. *Science.* 286, 1368–1371.

Puri V., Ranjit S., Konda S., Nicoloso S.M.C., Straubhaar J., Chawla A., Chouinard M., Lin C., Burkart A., Corvera S., Perugini R.A., Czech M.P. (2008). Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105(22), 7833–8.

Rabøl R., Petersen K.F., Dufour S., Flannery C., Shulman G.I. (2011). Reversal of muscle insulin resistance with exercise reduces postprandial hepatic de novo lipogenesis in insulin resistant individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 13705–13709.

Rector R.S., Uptergrove G.M., Morris E.M., Borengasser S.J., Laughlin M.H., Booth F.W., Thyfault J.P., Ibdah J.A. (2011). Daily exercise vs. caloric restriction for prevention of nonalcoholic fatty liver disease in the OLETF rat model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G874–G883.

Rietman A., Stanley T.L., Clish C., Mootha V., Mensink M., Grinspoon S.K., Makimura H. (2016). Associations between plasma branched-chain amino acids, β -aminoisobutyric acid and body composition. *J. Nutr. Sci.* 5:e6.

Rietman A., Stanley T.L., Clish C., Mootha V., Mensink M., Steven K., Grinspoon en Makimura H. (2016). Associations between plasma branched-chain amino acids, β -aminoisobutyric acid and body composition. *J. Nutr. Sci.*

Roberts L.D., Boström P., O'Sullivan J.F. et al. (2014). β -Aminoisobutyric Acid induces browning of white fat and hepatic β -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. *Cell Metabolism*; 19, 96–108.

Robinson W.G., Coon M.J. (1957). The purification and properties of beta-hydroxyisobutyric dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 225(1), 511–21.

Rodionov R.N., Jarzebska N., Weiss N., Lentz S.R. (2014). AGXT2: a promiscuous aminotransferase. *Trends Pharmacol. Sci.* 35(11):575-82.

Sanchez-Delgado G., Martinez-Tellez B., Olza J., Aguilera C.M., Gil A., Ruiz J.R. (2015). Role of Exercise in the Activation of Brown Adipose Tissue. *Ann. Nutr. Metab.* 67, 21–32.

Schnyder S. en Handschin C. (2015). Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise. *Bone*. 80, 115-25.

Shi CX., Zhao MX., Shu XD., Xiong XQ., Wang JJ., Gao XY., Chen Q., Li YH., Kang YM., Zhu GQ. (2016). β -aminoisobutyric acid attenuates hepatic endoplasmic reticulum stress and glucose/lipid metabolic disturbance in mice with type 2 diabetes. *Sci Rep.* 6, 21924.

Shimomura Y., Honda T., Shiraki M., Murakami T., Sato J., Kobayashi H., Mawatari K., Obayashi M. en Harris R.A. (2006). Branched-chain amino acid catabolism in exercise and liver disease. *J. Nutr. Suppl.* 136, 250S–253S.

Shimomura Y., Murakami T., Nakai N., Nagasaki M., Harris R.A. (2004). Exercise promotes BCAA catabolism: effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise. *J Nutr.* 134, 1583S-1587S.

Solem E., Jellum E., Eldjarn L. (1974). *Clin. Chim. Acta.* 50, 393-403.

Suhre K., Wallaschofski H., Raffler J., Friedrich N., Haring R., Michael K., Wasner C., Krebs A., Kronenberg F., Chang D., et al. (2011). A genomewide association study of metabolic traits in human urine. *Nat. Genet.* 43, 565–569.

Stryer L. (1995). "Fatty acid metabolism.". In: *Biochemistry.* (4^{de} ed.). New York, W.H. Freeman and Company. 603–628.

Tamaki N., Kaneko M., Kikugawa M., Fujimoto S. (1990). Evaluation of interconversion between (R)- and (S)-enantiomers of β -aminoisobutyrate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1035, 117-119.

Tsai K., Hsu T.G., Hsu K.M., Cheng H., Liu T.Y., Hsu C.F., Kong C.W. (2001). Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic Biol Med.* 31(11):1465-72.

Van Gennip A.H., Kamerling J.P., de Bree P.K., Wadman S.K. (1981). Linear relationship between the R- and S-enantiomers of β -aminoisobutyric acid in human urine. *Clin. Chim. Acta.* 116, 261-267.

Van Kuilenburg A.B.P., Stroomer A.E.M., Van Lenthe H., Abeling N.G.G.M., Van Gennip A.H. (2004). New insights in dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: a pivotal role for β -aminoisobutyric acid? *Biochem. J.* 379, 119–124.

Van Kuilenburg A.B., Van Lenthe H., Van Gennip A.H. (2006). Activity of pyrimidine degradation enzymes in normal tissues. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 25(9-11):1211-4.

Vøllestad N.K., Blom P.C. (1985). Effect of varying exercise intensity on glycogen depletion in human muscle fibres. *Acta Physiol. Scand.* 125(3):395-405.

Wagenmakers A.J., Beckers E.J., Brouns F., Kuipers H., Soeters P.B., van der Vusse G.J., Saris W.H. (1991). Carbohydrate supplementation, glycogen depletion, and amino acid metabolism during exercise. *Am J Physiol.* 260(6 Pt 1):E883-90.

Wagner K.H., Reichhold S., Hölzl C., Knasmüller S., Nics L., Meisel M., Neubauer O. (2010). Well-trained, healthy triathletes experience no adverse health risks regarding oxidative stress and DNA damage by participating in an ultra-endurance event. *Toxicology.* 278(2):211-6.

Wagner K.H., Reichhold S., Neubauer O. (2011). Impact of endurance and ultraendurance exercise on DNA damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1229:115-23.

Wanders R.J.A., Duran M., Loupatty F.J. (2012). Enzymology of the branched-chain amino acid oxidation disorders: the valine pathway. *J Inherit Metab Dis.* 35, 5–12.

Wang Z.W., Zhou Y.T., Kakuma T., et al. (1999). Comparing the hypothalamic and extrahypothalamic actions of endogenous hyperleptinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 10373–10378.

Winder W.W., Taylor E.B., Thomson D.M. (2006) Role of AMP-activated protein kinase in the molecular adaptation to endurance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38(11):1945-9.

Wu Z.D., Puigserver P., Andersson U., Zhang C.Y., Adelmant G., Mootha V., Troy A., Cinti S., Lowell B., Scarpulla R.C., and Spiegelman B.M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 98, 115–124.

Yamamoto T., Moriwaki Y., Takahashi S., Tsutsumi Z., Yamakita J., Higashino K. (1997). Effect of muscular exercise on the concentration of uridine and purine bases in plasma--adenosine triphosphate consumption-induced pyrimidine degradation. *Metabolism.* 46(11):1339-42.

Yanai J., Kakimoto Y., Tsujio T., Sano I. (1969). Genetic study of beta-aminoisobutyric acid excretion by Japanese. *Am. J. Hum. Genet.* 21(2), 115–132.

Yoshino Y., Abe M., Numata S., Ochi S., Mori Y., Ishimaru T., Kinoshita M., Umehara H., Yamazaki K., Mori T., Ohmori T., Ueno S. (2014). Missense variants of the alanine:glyoxylate aminotransferase 2 gene are not associated with Japanese schizophrenia patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 53, 137-41.

Websites:

www.ensembl.org (gebruikt op 14/04/2016)

www.who.int (gebruikt op 14/04/2016)