

University of Groningen

## The relevance of preanalytical factors in metabolomics and lipidomics research

Gil Quintero, Jorge Andres

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2018

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Gil Quintero, J. A. (2018). *The relevance of preanalytical factors in metabolomics and lipidomics research*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# 8

## **Summary and Future Perspectives**

Metabolomics and lipidomics are rapidly evolving fields of research due to their many applications. Currently, metabolic engineering/biotechnology (for example, to enhance the nutritional value of foods, to create “functional foods”, to improve microbial strains for the production of specific metabolites, or to modify plant metabolism, physiology, and development for breeding disease-resistant plants); nutrigenomics (the evaluation of the interaction of dietary components and the genome with the possibility of personalized diets to improve human health), as well as personalized medicine and pharmacology [(the prediction of drug response phenotypes (responders and non-responders))] are hot topics within lipidomics/metabolomics research. Nevertheless, conventional uses including disease diagnosis; drug discovery and development; toxicology (for example drug safety assessment), as well as taxonomy and phylogenetics (identification and classification of organisms, such as plants, bacteria, and fungus), continue being explored.

Despite the increase in applications and the substantial progress made in metabolomics/lipidomics analysis by means of improving analytical instrument technology and bioinformatics data evaluation performance, there is an undeniable lack of standardization of pre-analytical aspects including the experimental design and the sample processing stages. These, have an important impact on the acquisition of reliable and valid quantitative data, and as such were the main study targets during the development of this thesis.

Stability is an often overlooked issue in metabolomics studies that is particularly relevant when analyzing central carbon metabolites. Specifically, many metabolites belonging to the glycolysis, citric acid cycle and phosphate pentose pathways (also called energy metabolites) are intrinsically “activated” for chemical transformations and are therefore instable to various degrees. While enzymatic stability of energy metabolites has been properly addressed, non-enzymatic, chemical conversions lag behind. In order to contribute to the understanding of non-enzymatic degradation pathways of energy metabolites as well as their quantitative impact on the analytical results, in **Chapter 2** we reviewed the available literature regarding stability issues so far reported for nucleoside triphosphates, redox coenzymes, coenzyme A and its thioesters, as well as intermediate metabolites of the tricarboxylic acid cycle, glycolysis and pentose phosphate pathways. We further highlighted the interconversion of metabolites, a problem that is not commonly recognized in the context of metabolomics. Chemical degradation does not always mean disappearance

of a metabolite but may also lead to its interconversion into other chemical species that are by themselves metabolites of interest. An increase in metabolite concentration due to interconversion cannot be corrected for by the use of stable isotope-labelled internal standards (IS), in fact, we experimentally demonstrated that IS can significantly amplify the quantitative bias of interconverted metabolites. Therefore, gaining a better understanding of metabolite stability and notably metabolite interconversion to avoid introducing bias during the pre-analytical phase of metabolomics analysis remains critical.

As far as the work developed in this thesis is concerned, future research trying to address the previously mentioned issues should try answering the following key questions: (i) what is the chemical stability of energy metabolites and what are the chemical factors affecting stability (e.g. chemical composition of the storage/extraction medium, the presence of oxygen, metal ions), (ii) are there degradation pathways which are not accounted for in the literature, (iii) what are the kinetic parameters of the known conversion/degradation reactions under typical sample preparation conditions, and (iv) is it possible to devise strategies to correct for energy metabolite instability and to develop reliable, quantitative sample preparation procedures for this class of compounds?

In **Chapter 3** we addressed these questions by evaluating the stability of nucleotide triphosphates (ATP, GTP, UTP, and CTP) under typical boiling ethanol conditions, an extraction approach initially introduced for yeast, that has become one of the most frequently used methods for metabolomics studies in other biological systems. Moreover, we determined the effect of a complex cellular matrix on the nucleotide degradation profiles. Extracting pure solutions of the purine and pyrimidine nucleotide triphosphates with ethanol at 95 °C resulted in degradation with a subsequent and steady, time-dependent increase in the concentration of nucleotide diphosphates (ADP, GDP, UDP and CDP). Surprisingly, by incubating unlabeled ATP, GTP, UTP and CTP together with a complex cellular matrix (a <sup>13</sup>C-labeled yeast extract) a significant decrease in degradation kinetics was observed, indicating a stabilizing effect of the matrix. To explain this matrix stabilization phenomenon, we studied the influence of the culture medium (e.g. carbon source, vitamins, macro and micro elements) and particular groups of central carbon metabolites (amino acids, organic acids, sugar phosphates, coenzymes, and other nucleotides). The basis of the observed stabilizing effect of the yeast matrix and possibly other cellular matrices

remained, however, unexplained. Furthermore, we observed interconversion of structurally-related metabolites such as NADPH and NADP<sup>+</sup> into ADP and NADH, NAD<sup>+</sup> or FAD into AMP. Therefore, we believe that upcoming research should be focused on studying the interconversion of metabolites in pilot experiments prior to large-scale metabolomics, besides expanding the set of experiments performed here to explore degradation/interconversion issues of other relevant energy metabolites.

Since lipidomics is a field of research derived from metabolomics, it basically follows the same experimental design and workflow. As such, there is also a lack of awareness on how lipid stability is affected during the pre-analytical stage. In **Chapter 4**, we provide an overview of lipidomics, paying attention to common pitfalls during a typical lipidomics workflow and suggesting ways to avoid them. First, we cover the phase of defining the biological/clinical question and the corresponding experimental design, and second, the bioanalytical phase during which sampling, storage, sample handling, metabolism quenching, lipid/metabolite extraction and LC-MS(/MS) protocols need to be defined and executed. Since lipidomics is currently moving towards its use as a diagnostic tool in a regulated clinical environment, addressing lipid stability issues and avoiding the introduction of bias during the pre-analytical phase of the analysis is critical for the further development of the field. Consequently, standardization of all procedures involved in lipidomics experiments is a prerequisite for obtaining reliable and unbiased results.

Currently, there is no single extraction technique able to extract all lipid classes from a biological matrix (tissue, biological fluids or cells) in a quantitative manner. Therefore, by using untargeted lipidomics **Chapter 5** contributes to the standardization of the pre-analytical stage, focusing on extraction as a critical step for lipid analysis. We compared the most commonly used liquid-liquid extraction methods for lipid analysis (named Folch, Bligh & Dyer and MTBE extraction), which are based on mixtures of chloroform/methyl tert-butyl ether and methanol, with a recently introduced one-phase extraction system based on a mixture of MeOH/MTBE/CHCl<sub>3</sub> (MMC). We also describe a novel approach to evaluate differences/similarities between different extraction methods and a pooled sample by using hierarchical clustering analysis (HCA). Principal component analysis (PCA) was used to initially display general trends, samples clustering, and possible outliers. Clear clustering of samples according to the extraction methods was found, indicating that different lipid profiles were acquired with the tested extraction methods. Both in positive and

negative ionization mode, HCA showed that the MMC extraction turned out to be qualitatively and quantitatively closest to a pooled extract, indicating that the lipid profile obtained with this method is most similar to the average standard extract. Due to the results obtained in this chapter, together with the experimental simplicity of the one-phase approach in comparison to biphasic extraction methods, we suggest that the MMC extraction approach is the preferred method for untargeted lipid analysis. Furthermore, we observed significant differences between the pooled and Bligh & Dyer extracts. Particularly, we found that polar lipid species like LPC or FA are lost in the methanol-rich hydrophilic phase of this extraction approach. This indicates that even though the Bligh & Dyer method is one of the most popular approaches for lipid analysis, it might not be well suited for untargeted lipidomics and its usefulness should be thoroughly re-evaluated in future research.

Alterations in metabolism due to functional responses of a biological system to any given condition result in changes in the abundance of groups of metabolites that form characteristic patterns. This, also called biomarker discovery, can be used to derive insights into the underlying biological state and is the basis of all the applications previously mentioned for metabolomics/lipidomics studies (see above). In **Chapter 6** we perform a comprehensive translational work in which we establish the strong involvement of *Oplah*, a gene encoding for 5-oxoprolinase, in the development of heart failure (HF). Our results demonstrate that OPLAH depletion occurs as a result of cardiac injury, and leads to elevated 5-oxoproline levels together with oxidative stress, whereas OPLAH overexpression in transgenic mice improves cardiac function after ischemic injury. We then evaluated the mortality rate in a large cohort of patients with HF and found a clear association between outcome and plasma levels of 5-oxoproline. Our findings thus suggest that OPLAH is a potential target for therapeutic intervention in patients with HF and that its substrate, 5-oxoproline, might be used as a circulating biomarker for predicting adverse outcome in such patients. 5-oxoproline is embedded in the  $\gamma$ -glutamyl cycle but it is not the only key component. This cycle is responsible for the production of glutathione (GSH), the major source of antioxidants in mammalian cells, and as such its involvement in oxidative stress-related diseases including HF should be thoroughly addressed.

To obtain a better understanding of the involvement of the  $\gamma$ -glutamyl cycle in heart failure, it is essential to decipher how key components change under physiological and pathophysiological conditions. In **Chapter 7** we report the development and

validation of an LC-MS method for the simultaneous quantitation of key components of the  $\gamma$ -glutamyl cycle including 5-oxoproline, L-glutamate, GSH and GSSG. Changes in concentration levels were evaluated in different biological samples (heart, kidney, liver, plasma and urine) of mice with and without myocardial infarction (MI). From a methodological point of view, we show that certain biological matrices may lead to interferences. From a disease mechanism point of view, we show that the failing heart has limited anti-oxidant capacity compared to the kidneys and the liver, making it particularly vulnerable to ROS. Besides the clinical usefulness of the GSH/GSSG ratio as an index of oxidative stress, our results suggest that 5-oxoproline is an easily measurable biomarker of oxidative stress related to cardiovascular disease that merits further validation. Interestingly, in comparison with other matrices, fairly high 5-oxoproline levels were found in urine samples. Given the non-invasive character of sampling urine, upcoming clinical research could be focused on the evaluation of 5-oxoproline levels in urine samples to further evaluate the usefulness of this metabolite as a biomarker in patients with HF.

## Nederlandse Samenvatting

Metabolomics en lipidomics zijn snel evoluerende onderzoeksvelden vanwege hun vele toepassingen. Momenteel zijn metabolische engineering / biotechnologie (bijvoorbeeld om de voedingswaarde van voedingsmiddelen te verbeteren, om “functionele voedingsmiddelen” te creëren, om microbiële stammen te verbeteren voor de productie van specifieke metabolieten, om planten te ontwikkelen die resistent zijn tegen ziekten door het metabolisme, fysiologie en ontwikkeling van de planten aan te passen), nutrigenomics (de evaluatie van de interactie van voedingscomponenten en het genoom om de gezondheid van de mens te verbeteren met een persoonlijk dieet), evenals geneeskunde en farmacologie op maat [(de voorspelling van fenotypes van de reactie op geneesmiddelen (responders en non-responders))] populaire onderwerpen binnen lipidomics/metabolomics onderzoek. Daarnaast is er ook verder onderzoek in conventionele toepassingen waaronder ziektediagnostiek, het ontdekken en ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen, toxicologie (bijvoorbeeld beoordeling van geneesmiddelveiligheid), evenals taxonomie en fylogenetica (identificatie en classificatie van organismen, zoals planten, bacteriën en schimmels).

Ondanks de toename in toepassingen en de aanzienlijke vooruitgang in metabolomics/lipidomics onderzoek door middel van verbetering van analytische instrumentele technologie en bio-informatische gegevensverwerking, is er een onmiskenbaar gebrek aan standaardisatie van pre-analytische aspecten, inclusief het experimentele ontwerp en de monster voorbereidingsstappen. Deze aspecten hebben een belangrijke impact op het verkrijgen van betrouwbare kwantitatieve gegevens en zijn daarom de belangrijkste onderzoeksdoelen voor de opzet van dit proefschrift.

Stabiliteit is een probleem dat vaak over het hoofd gezien in metabolomics onderzoeken, maar is vooral relevant bij het analyseren van centrale koolstofmetabolieten. Specifiek zijn dit veel metabolieten die behoren tot de glycolyse, citroenzuurcyclus en pentosefosfaatcyclus (ook wel energiemetabolieten genoemd), die intrinsiek “geactiveerd” zijn voor chemische transformaties en daarom in verschillende mate instabiel zijn. Hoewel de enzymatische stabiliteit van energiemetabolieten naar behoren is bestudeerd, blijft het onderzoek naar de niet-enzymatische, chemische omzettingen achter. Om bij te dragen aan het begrip van



niet-enzymatische afbraakroutes van energiemetabolieten evenals hun kwantitatieve impact op de resultaten, hebben we in **Hoofdstuk 2** de beschikbare literatuur over stabiliteitsproblemen onderzocht die tot nu toe zijn gerapporteerd voor nucleoside-trifosfaten, redox-coënzymen, co-enzym A en zijn thioesters, evenals de intermediaire metabolieten van de citroenzuurcyclus, glycolyse en pentosefosfaatcyclus. We hebben verder de interconversie van metabolieten benadrukt, een probleem dat in de context van de metabolomics niet vaak wordt onderkend. Chemische afbraak betekent niet altijd het verdwijnen van een metaboliet, maar kan ook leiden tot de omzetting ervan in andere chemische soorten die zelf ook belangrijke metabolieten zijn. Een verhoging van de metabolietconcentratie als gevolg van interconversie kan niet worden gecorrigeerd door het gebruik van stabiele isotoop-gelabelde interne standaarden (IS), in feite hebben we experimenteel aangetoond dat IS de kwantitatieve afwijking van geïnterconverteerde metabolieten aanzienlijk kan versterken. Daarom is het cruciaal om meer inzicht te krijgen in de metabolietstabiliteit en met name metaboliet-interconversie om te voorkomen dat bias geïntroduceerd wordt tijdens de pre-analytische fase van metabolomics-analyse.

Wat betreft het werk dat in dit proefschrift is ontwikkeld, zou toekomstig onderzoek dat de eerder genoemde problemen probeert aan te pakken, de volgende hoofdvragen moeten beantwoorden: (i) wat is de chemische stabiliteit van energiemetabolieten en wat zijn de chemische factoren die de stabiliteit beïnvloeden (bijv. chemische samenstelling van het opslag/extractiemedium, de aanwezigheid van zuurstof, metaalionen), (ii) zijn er afbraakroutes die niet in de literatuur worden vermeld, (iii) wat zijn de kinetische parameters van de bekende omzetting/afbraakreacties onder typische monster voorbereidingsomstandigheden en (iv) is het mogelijk om strategieën te ontwikkelen om de instabiliteit van de energiemetabolieten te corrigeren en om betrouwbare, kwantitatieve monstervoorbereidingsprocedures voor deze klasse verbindingen te ontwikkelen?

In **Hoofdstuk 3** hebben we deze vragen behandeld door de stabiliteit van nucleotide-trifosfaten (ATP, GTP, UTP en CTP) te evalueren onder typisch kokende ethanolcondities, een extractiemethode die oorspronkelijk werd geïntroduceerd voor studies in gist, maar die nu een van de meest gebruikte methoden voor metabolomics studies is geworden in andere biologische systemen. Bovendien bepaalden we het effect van een complexe cellulaire matrix op de nucleotide-afbraakprofielen. Extractie van zuivere oplossingen van de purine- en pyrimidine-nucleotide-

trifosfaten met ethanol bij 95 °C resulteerde in afbraak met een daaropvolgende en stabiele tijdsafhankelijke toename in de concentratie van nucleotide-difosfaten (ADP, GDP, UDP en CDP). Verrassend genoeg werd door het incuberen van niet-gelabeld ATP, GTP, UTP en CTP tezamen met een complexe cellulaire matrix (een met <sup>13</sup>C gelabelde gistextract) een significante vermindering in afbraakkinetiek waargenomen, wat een stabiliserend effect van de matrix aangeeft. Om dit fenomeen van matrixstabilisatie te verklaren, hebben we de invloed van het kweekmedium (bijv. koolstofbron, vitaminen, macro- en micro-elementen) en bepaalde groepen van centrale koolstofmetabolieten (aminozuren, organische zuren, suikerfosfaten, co-enzymen en andere nucleotiden) bestudeerd. De basis van het waargenomen stabiliserende effect van de gistmatrix en mogelijk andere cellulaire matrices bleef echter onverklaard. Verder observeerden we de interconversie van structureel gerelateerde metabolieten zoals NADPH en NADP<sup>+</sup> in ADP en NADH, NAD<sup>+</sup> of FAD in AMP. Daarom zijn wij van mening dat verder onderzoek gericht moet zijn op het bestuderen van de interconversie van metabolieten in kleinschalige experimenten voorafgaand aan grootschalige metabolomics studies, naast het uitbreiden van de set experimenten die hier uitgevoerd zijn om degradatie/interconversieproblemen van andere relevante energiemetabolieten te onderzoeken.

Omdat lipidomics een onderzoeksgebied is dat afgeleid is van metabolomics, volgt het in feite hetzelfde experimentele ontwerp en dezelfde workflow. Als zodanig is er ook een gebrek aan bewustzijn over hoe de lipidestabiliteit wordt beïnvloed tijdens de pre-analytische fase. In **Hoofdstuk 4** geven we een overzicht van lipidomics, waarbij aandacht wordt besteed aan gebruikelijke valkuilen tijdens een typische lipidomics-workflow en waarbij suggesties worden gedaan om deze te vermijden. Eerst behandelen we de fase van het definiëren van de biologische/klinische vraag en het bijbehorende experimentele ontwerp, en ten tweede de bioanalytische fase waarin bemonstering, opslag, monstervoorbewerking, stoppen van de metabolische activiteit, lipiden/metabolietenextractie en LC-MS(/MS) -protocollen moeten worden gedefinieerd en uitgevoerd. Aangezien het gebruik van lipidomics studies momenteel verschuift naar de toepassingen als een diagnostisch hulpmiddel in een gereguleerde klinische omgeving, is het aanpakken van lipidestabiliteitskwesaties en het voorkomen van de introductie van afwijkingen tijdens de pre-analytische fase in de analyse van cruciaal belang voor de verdere ontwikkeling van het veld. Daarom is standaardisatie van alle procedures die betrokken zijn bij lipidomics-experimenten een voorwaarde voor het verkrijgen van betrouwbare resultaten zonder afwijkingen.

Momenteel is er geen enkele extractietechniek die in staat is om alle lipideklassen uit een biologische matrix (weefsel, biologische vloeistoffen of cellen) op een kwantitatieve manier te extraheren. Daarom draagt **Hoofdstuk 5** door het gebruik van niet-gerichte lipidomics bij aan de standaardisatie van de pre-analytische fase, waarbij de nadruk ligt op extractie als een cruciale stap voor lipidenanalyse. We vergeleken de meest algemeen gebruikte vloeistof-vloeistof-extractiemethoden voor lipidenanalyse (genaamd Folch, Bligh & Dyer en MTBE-extractie), die gebaseerd zijn op mengsels van chloroform/methyl-tert-butylether en methanol, met een recent geïntroduceerde eenfase-extractie systeem gebaseerd op een mengsel van MeOH/MTBE/CHCl<sub>3</sub> (MMC). We beschrijven ook een nieuwe benadering om verschillen/overeenkomsten tussen verschillende extractiemethoden en een gemiddeld (samengevoegd) monster te evalueren met behulp van hiërarchische clusteranalyse (HCA). Hoofdcomponentenanalyse (PCA) werd gebruikt om in eerste instantie algemene trends, clusters en mogelijke uitschieters weer te geven. Er werden duidelijke clusters van monsters per extractiemethode gevonden, wat aangeeft dat verschillende lipideprofielen werden verkregen met de geteste extractiemethoden. Zowel in positieve als in negatieve ionisatiemodus toonde HCA aan dat de MMC-extractie kwalitatief en kwantitatief het dichtst bij een samengevoegd monster bleek te liggen, wat aangeeft dat het lipidenprofiel dat met deze methode wordt verkregen het meest overeenkomt met het gemiddelde standaardextract. Vanwege de in dit hoofdstuk verkregen resultaten, samen met de experimentele eenvoud van de éénfasebenadering in vergelijking met bifasische extractiemethoden, stellen we voor dat de MMC-extractiebenadering de voorkeursmethode is voor niet-gerichte lipidenanalyse. Bovendien hebben we significante verschillen waargenomen tussen het gemiddelde monster en Bligh & Dyer-extracten. In het bijzonder hebben we gevonden dat polaire lipidesoorten zoals LPC of FA verloren gaan in de methanolrijke hydrofiele fase van deze extractiebenadering. Dit geeft aan dat, hoewel de Bligh & Dyer-methode een van de meest populaire benaderingen voor lipidenanalyse is, deze methode misschien niet het meest geschikt is voor niet-gerichte lipidomics en het nut ervan grondig moet opnieuw geëvalueerd worden voor toekomstig onderzoek.

Veranderingen in het metabolisme als gevolg van functionele reacties in een biologisch systeem op een gegeven conditie resulteren in veranderingen in de abundantie van groepen van metabolieten die karakteristieke patronen vormen. Dit wordt ook biomarker-ontdekking genoemd en kan worden gebruikt om inzichten in de onderliggende biologische toestand af te leiden en is de basis van

alle eerder genoemde toepassingen voor metabolomics/lipidomics-onderzoeken (zie hierboven). In **Hoofdstuk 6** voeren we een uitgebreid translationeel werk uit waarin we de sterke betrokkenheid vastleggen van *Oplah*, een gen dat codeert voor 5-oxoprolinase, in de ontwikkeling van hartfalen (HF). Onze resultaten tonen aan dat OPLAH-verlaging optreedt als een gevolg van hartbeschadiging en leidt tot verhoogde 5-oxoprolinespiegels samen met oxidatieve stress, terwijl OPLAH-overexpressie in transgene muizen de hartfunctie verbetert na ischemisch letsel. Vervolgens evalueerden we het sterftecijfer in een groot cohort van patiënten met HF en vonden we een duidelijke associatie tussen de uitkomst en de plasmaspiegels van 5-oxoprolin. Onze bevindingen suggereren dus dat OPLAH een potentieel doelwit is voor therapeutische interventie bij patiënten met HF en dat zijn substraat, 5-oxoprolin, kan worden gebruikt als een circulerende biomarker voor het voorspellen van nadelige uitkomsten bij dergelijke patiënten. 5-oxoprolin is ingebed in de  $\gamma$ -glutamylcyclus, maar het is niet de enige sleutelcomponent. Deze cyclus is verantwoordelijk voor de productie van glutathione (GSH), de belangrijkste bron van antioxidanten in cellen van zoogdieren, en als zodanig moet de betrokkenheid ervan bij aan oxidatieve stress gerelateerde ziekten, waaronder HF, grondig worden bestudeerd.

Voor een beter begrip van de betrokkenheid van de  $\gamma$ -glutamylcyclus bij hartfalen, is het essentieel om te ontcijferen hoe belangrijke componenten veranderen onder fysiologische en pathofysiologische omstandigheden. In **Hoofdstuk 7** rapporteren we de ontwikkeling en validatie van een LC-MS-methode voor de gelijktijdige kwantificatie van de belangrijkste componenten van de  $\gamma$ -glutamylcyclus waaronder 5-oxoprolin, L-glutamaat, GSH en GSSG. Veranderingen in concentratieniveaus werden geëvalueerd in verschillende biologische monsters (hart, nier, lever, plasma en urine) van muizen met en zonder myocardiaal infarct (MI). Vanuit een methodologisch oogpunt laten we zien dat bepaalde biologische matrices kunnen leiden tot interferenties. Vanuit het oogpunt van ziektemechanismen laten we zien dat het falende hart een beperkte antioxidatieve capaciteit heeft in vergelijking met de nieren en de lever, waardoor het bijzonder kwetsbaar is voor ROS. Naast de klinische bruikbaarheid van de GSH / GSSG-ratio als een index van oxidatieve stress, suggereren onze resultaten dat 5-oxoprolin een gemakkelijk meetbare biomarker is van oxidatieve stress gerelateerd aan hart- en vaatziekten die verdere validatie verdient. Interessant is dat in vergelijking met andere matrices vrij hoge 5-oxoprolin-niveaus werden gevonden in urinemonsters. Gezien het niet-invasieve

karakter van het verzamelen van urine, zou aankomend klinisch onderzoek kunnen worden geconcentreerd op de evaluatie van 5-oxoproline niveaus in urinemonsters om de bruikbaarheid van dit metaboliet als een biomarker bij patiënten met HF verder te evalueren.