

PARAFAC, NMR og lipoproteiner

PARAFAC er særlig velegnet til analyse af fluorescens-data, men metoden er også relevant for andre datastrukturer. Her vises, hvordan PARAFAC kan anvendes til at modellere diffusionsvægtede NMR-data med henblik på lipoprotein-profilering af blod.

Af Søren Balling Engelsen, Rasmus Bro, Institut for Fødevarevidenskab, Københavns Universitet og Lars Nørgaard, FOSS

Personer som lider af type II diabetes og fedme har en forøget risiko for alvorlige sygdomme. Risikoen for udvikling af hjertekarsygdomme har vist sig at være relateret til fordelingen af kolesterol og triglycerider i forskellige typer af lipoproteiner i blodet. Det er derfor vigtigt at være i stand til at måle og overvåge lipoproteinprofiler både mht. at diagnosticere individuel risiko samt for ernæringsstudier og ved afprøvninger af nye medikamenter.

Lipoproteiner er micellulære triglycerid- og kolesterol-transportmolekyler, der kan inddeles i fire hovedgrupper baseret på deres densitet. Denne opdeling er delvist empirisk baseret og strækker sig fra Very-Low-Density-Lipoproteins (VLDL; mellem 0,940 og 1,006 mg/mL) over Intermediate-Density-Lipoproteins (IDL; mellem 1,006 og 1,019 mg/mL), Low-Density-Lipoproteins (LDL; mellem 1,019 og 1,063 mg/mL) og High-Density-Lipoproteins (HDL; 1,063 and 1,21 mg/mL).

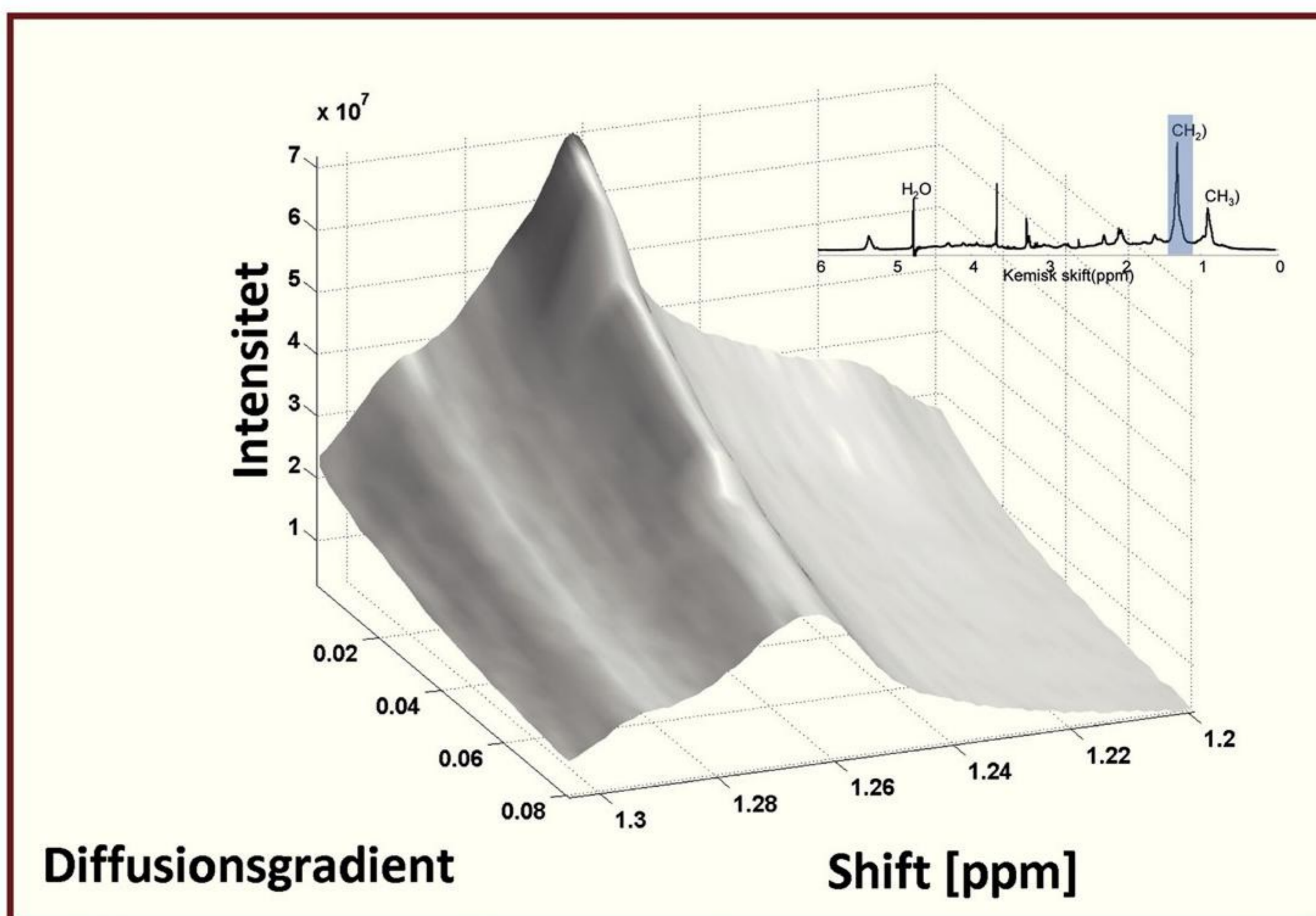
Ultracentrifugering er den etablerede referencemetode til separation og dermed kvantificering af lipoproteiner.

Det har imidlertid vist sig, at blodets lipoproteiner også kan måles med NMR-spektroskopi. De forskellige densiteter af lipoproteiner-

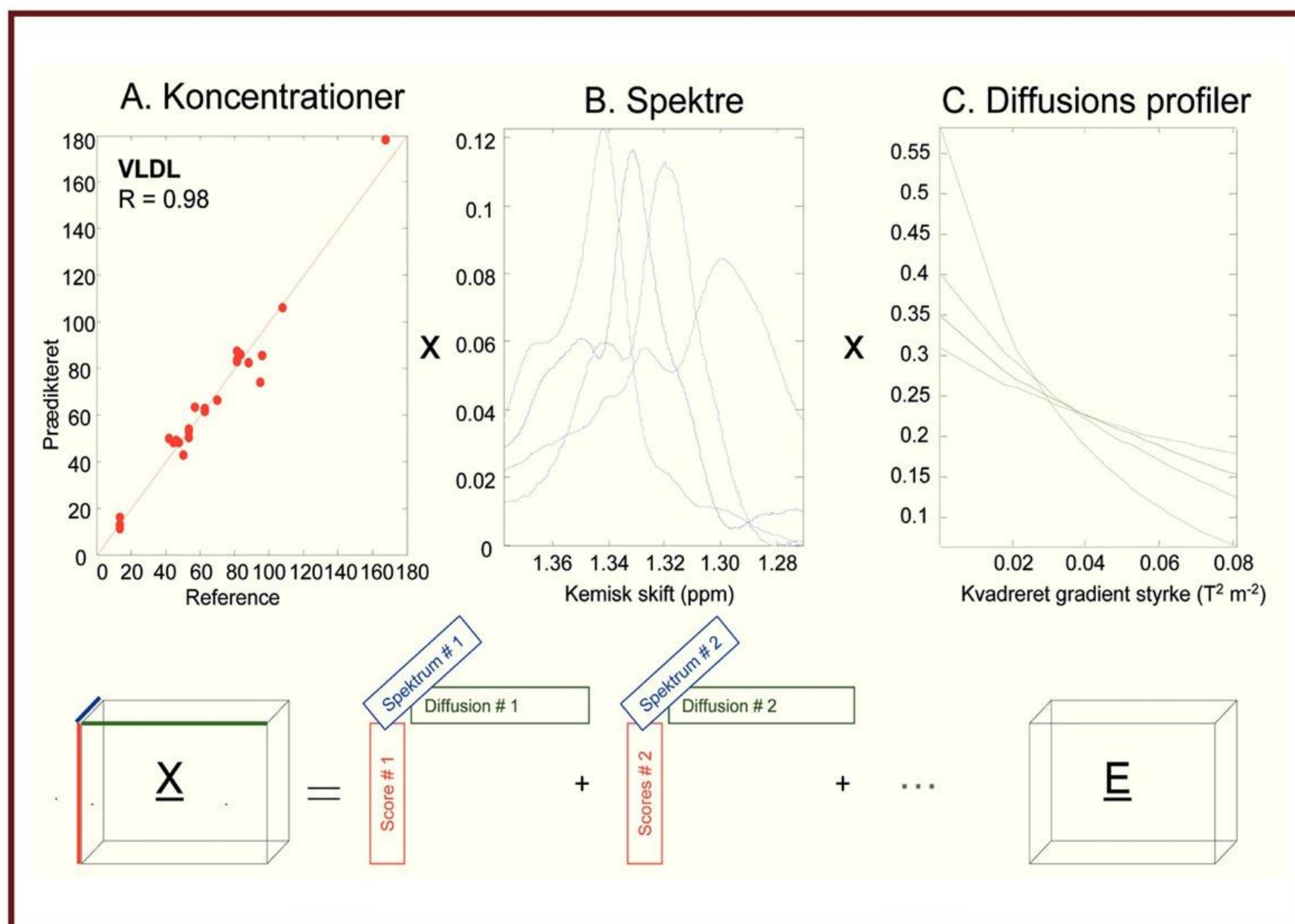
ne giver anledning til små ændringer i deres lokale magnetiske felter og tilsvarende små skift i deres resonansfrekvenser. De resulterende spektre er meget komplekse og stærkt overlappende. Kvantificering af de forskellige lipoprotein-typer kan bedst foretages med kalibrering via f.eks. Partial Least Squares regression (PLS) til en referencemetode.

Til lipoprotein-profilering kan man imidlertid også udnytte en anden teknik i moderne NMR-spektroskopi nemlig diffusions-vægtet, såkaldt diffusionsediteret, NMR. Ved denne metode optages NMR-spektre som en funktion af molekylernes diffusionsegenskaber ved at påtrykke en gradvist stigende feltgradient. Molekyler, der diffunderer hurtigt, vil således ikke kunne refokuseres 100%, hvorved deres signal vil mindskes. Figur 1 viser et udsnit af et diffusionsediteret NMR-spektrum af en blodprøve.

Som det ses, har sådanne NMR-data to dimensioner: en kemisk skift-retning og en gradient/diffusionsretning. I lipoprotein-tilfældet vil de forskellige lipoproteiner diffundere forskelligt pga. af deres forskellige størrelser.



Figur 1. Et eksempel på 2D diffusionsediteret NMR-spektrum af methylensignalet. "Insert" øverst viser det normale 1D NMR-spektrum.



Figur 2. PARAFAC-modellen af diffusionsediterede NMR-spektre af plasmaprøver med fire komponenter. Nederst et skematisk diagram af PARAFAC-modellen. (A) eksempel på en korrelation mellem koncentrationsprofilen af en PARAFAC-komponent og VLDL. (B) de fire spektrale PARAFAC loadings og (C) diffusionsprofiler af de fire PARAFAC-komponenter.

Data

Data stammer fra et studie præsenteret i [1], hvor blodprøver fra 17 frivillige med en stor variation i totalt triglycerid-indhold blev udvalgt for at spænde over en stor variation i lipoprotein-subfraktioner. Blodet blev tilsat EDTA og centrifugeret. Ved ultracentrifugering blev lipoprotein-hovedfraktionerne VLDL, IDL, LDL og HDL separeret fra plasmaet og kvantificeret.

Plasmaprøverne blev præpareret i 5 mm NMR-rør, og de diffusionsediterede protonspektre blev optaget ved 318 K på et Bruker DRX500 ved 11,7 T.

PARAFAC

Når data fra komplekse blandinger modelleres med PARAFAC, behøver man ikke at antage noget om den spektrale form eller fordeling. De eneste antagelser, der er nødvendige for en PARAFAC-model, er

1. at data har lav rang og er trilineære, dvs. kan beskrives som et produkt af tre komponent-matricer,
2. at koncentrationerne og spektrene af de forskellige analytter er forskellige. Dette krav kan endda blødes op under nogle omstændigheder [2].

PARAFAC-løsningen bestemmes alene på grundlag af det valgte antal komponenter og de målte data.

Når man eksempelvis laver en model af området omkring kemisk skift 1,3, som afspejler CH_2 , så finder man at fire PARAFAC-komponenter er passende.

Denne PARAFAC-model er illustreret i figur 2. I virkeligheden er der ikke tale om, at lipidernes spektre består af en kombination af fire "rene" spektre. I stedet er der i realiteten tale om et kontinuum af spektre. Imidlertid tilsiger PARAFAC-modellen, at disse målte spektre i praksis kan modelleres med fire arketype spektre.

Lipoprotein-fraktionerne er oprindeligt defineret ud fra ultracentrifugering og validiteten af PARAFAC-modellen kan vises

ved, at scoreværdierne kan anvendes til at prædiktere eksempelvis VLDL-koncentration som vist i figuren.

I dette tilfælde kan man også validere PARAFAC-modellen ved at beregne diffusionskoefficienter og hydrodynamisk radius ud fra de fire resolverede komponenters diffusionsprofiler (figur 2). Det gøres ved at benytte Stoke-Einstein-relationen for diffusion af en sfærisk partikel. Resultatet giver hydrodynamiske radier på henholdsvis 29, 18, 12 og 6 nm, som er i god overensstemmelse med de i litteraturen opgivne radius-intervaller [40-17,5], [17,5-12,5], [12,5-9] og [6-2,5] nm for VLDL, IDL, LDL og HDL [3]. Dette er et godt eksempel på ekstern fysisk-kemisk validering af en multivariat kemometrisk model.

Outro

I det viste eksempel tog det tre timer at optage diffusionsediterede NMR-spektre. Selvom det stadig er langt hurtigere og meget mere effektivt og mindre prøveforbrugende (mikroliter fremfor deciliter) end lipoprotein-bestemmelse ved ultracentrifugering, så kan denne situation nemt optimeres ved at optage med færre skanninger og ved færre gradientniveauer. Faktisk fungerer PARAFAC-modellen under ideelle omstændigheder helt ned til to gradientniveauer.

Referencer

1. M. Dyrby, M. Peteresen, A. D. Whittaker, L. Lambert, L. Nørgaard, R. Bro, & S. B. Engelsen. Analysis of lipoproteins using 2D diffusion-edited NMR spectroscopy and multi-way chemometrics. *Anal.Chim.Acta* 531:209-216, 2005.
2. N. D. Sidiropoulos, R. Bro. On the Uniqueness of Multilinear Decomposition of N-way Arrays. *J.Chemom.* 14 (3):229-239, 2000.
3. P.B. Duell, D.R. Illingworth, W.E. Connor, in: P. Felig, L.A. Frohman (Eds.), *Endocrinology and Metabolism*, 4th ed., McGraw-Hill, New York, 2001, p. 993.