

# Måling af lipoproteiner i blod

NMR-spektroskopiske målinger kan hurtigt kvantificere lipoprotein-profiler og giver dermed nye muligheder for ernærings- og sundhedsforskningen.

Af Violetta Aru, Bekzod Khakimov og Søren B. Engelsen, Foodomics, Institut for Fødevarevidenskab, Københavns Universitet

Det er velkendt for de fleste, at HDL-kolesterol er godt og at LDL-kolesterol er skidt, men hvad står egentligt LDL og HDL for, og findes der andre typer af lipoproteiner, og hvordan måles de egentlig? Vi vil her demonstrere, hvordan man hurtigt kan måle lipoprotein-profiler ved hjælp af <sup>1</sup>H NMR-spektroskopi.

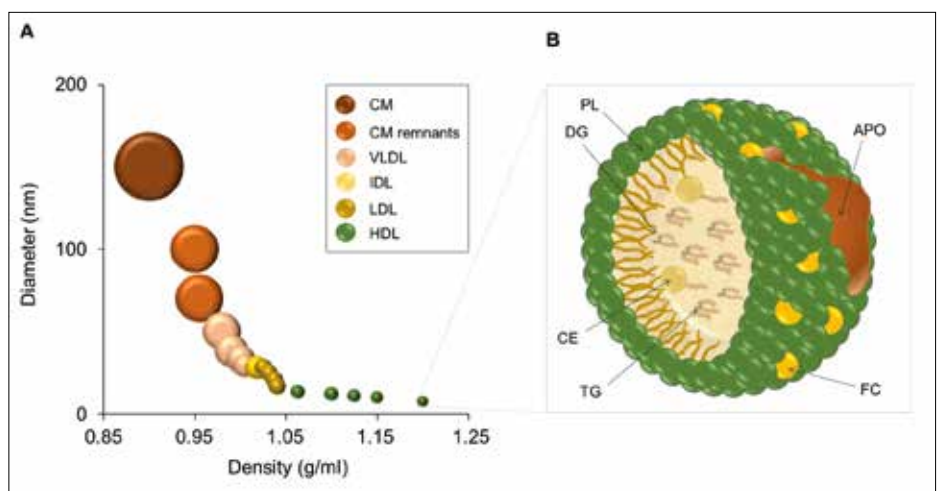
## Det fede blod

Personer, som lider af type 2-diabetes og fedme har en forøget risiko for alvorlige sygdomme. Risikoen for udvikling af hjerte-kar-sygdomme har vist sig at være relateret til fordelingen af kolesterol og triglycerider i forskellige typer af lipoprotein-partikler i blodet. Det er derfor vigtigt at være i stand til at måle og overvåge lipoprotein-profiler, både med hensyn til at diagnosticere individuel risiko samt for ernæringsstudier og ved afprøvninger af ny medicin.

Blod består hovedsageligt af plasma (55 procent) og røde og hvide blodlegemer (45 procent). Plasma er den flydende bestanddel af blod og består foruden vand (90 procent) af sukker, proteiner, lipider og salte (10 procent) [1]. Da hydrofobe ikke-polære lipider ikke er opløselige i vand, transporteres de gennem det vandige miljø i plasma indlejret i supramolekylære aggregater kaldet lipoproteiner (LP'er). Man kan betragte lipoproteinerne som små lipid-pakker med en polær overflade bestående af proteiner kaldet apolipoproteiner, phospholipider og cholesterylester. Inde i pakkerne indeholder lipoproteinerne lipider (mono-, di- og triglycerider) og kolesterol, som transporteres med blodet rundt i kroppen [2]. Lipoproteiner er micellulære triglycerid- og



Foto: Unsplash



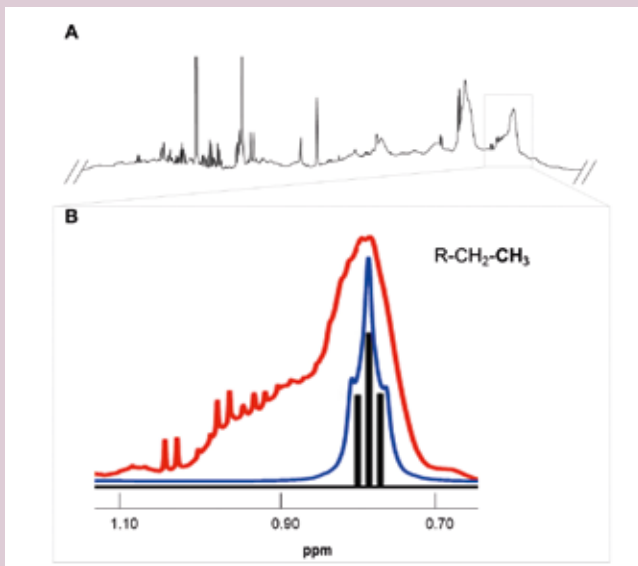
Figur 1. a) De forskellige lipoproteiner (LP) og deres størrelse og densitet. CM: chylomicrons; VLDL: very low-density lipoproteins; IDL: intermediate density lipoproteins, LDL: low density lipoproteins; HDL: high density lipoproteins. b) Typisk lipoprotein micellar struktur. APO: apolipoproteiner; CE: esterificeret kolesterol; DG: diglycerider; FC: frit kolesterol; PL: phospholipid; TG: triglycerider. Modificeret fra Aru et al. [3].

Måling af lipoproteiner med kernemagnetisk resonans (NMR) spektroskopi. NMR er baseret på, at nogle atomkerner (for eksempel  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  m.fl.) absorberer energi i form af elektromagnetisk stråling som en funktion af frekvensen. Frekvensen for absorption afhænger hovedsageligt af kernetyper (for eksempel  $^1\text{H}$  eller  $^{13}\text{C}$ ) og dets kemiske miljø (for eksempel methyl- eller methylen-protoner).

Mange kemikere kender NMR-spektroskopi i forbindelse med molekylær strukturopløsning og måske endda kvantificering af kemiske blandinger, hvor spektrene består af et stort antal smalle og baseline-separerede signaler for eksempel i proton ( $^1\text{H}$ ) NMR metabolomics af blodprøver. Der er imidlertid visse fysiske effekter, som kan brede signalerne ud og ændre deres position (kemisk skift), herunder blandt andet translational og rotationel diffusion, som igen er afhængig af størrelsen af makromolekyler og supramolekylære aggregater [12].

Nøjagtig denne egenskab gør  $^1\text{H}$  NMR til en unik analytisk platform til måling af lipoprotein partikelfordelinger (LPD), da forskellige LP-fraktioner har forskellige størrelser og sammensætning og dermed forskellige magnetiske følsomheder [13]. Dette giver igen anledning til karakteristiske  $^1\text{H}$  NMR-signaler, hvis kemiske skift hovedsageligt bestemmes af den lokale elektrontæthed og rotationsdiffusion af lipoproteinerne.

Det er netop derfor, at et  $^1\text{H}$  NMR-spektrum af blod/plasma viser en stor mængde velseparerede signaler og to "fede" signaler (se figur 2A). De to fede signaler kan tilskrives protoner i methylen ( $-\text{CH}_2-$ ) og methyl ( $-\text{CH}_3$ ) grupper, der stammer fra fedtsyrerne i lipoproteinerne. De store og mindre tætte LP-partikler (for eksempel VLDL og LDL) resonerer ved lavere feltstyrke (højere frekvens) end lipidsignalerne fra de mindre LP (dvs. HDL). Figur 2B illustrerer, hvordan kompleksiteten af lipid-signalerne ( $-\text{CH}_3$ ) øges, når kompleksiteten af prøvematrixen øges fra teoretiske linjer i en model fedtstof/alkan (sort), via et rent lipidsystem (triglycerid) (blå) til lipider inde i lipoproteiner (rød). Området mellem 0,60 og 1,40 ppm er det spektrale område, der anvendes til bestemmelse af lipoproteinprofiler.



Figur 2. Kompleksiteten af lipidsignaler i blod. Repræsentativ  $^1\text{H}$ -NMR-spektrum af humant blod (A) med et zoom, der viser NMR-signalerne fra  $-\text{CH}_3$ -gruppe som teoretiske alkanlinjer (sort streg), som rent fedt med konformationelle frihedsgrader (blå streg) og som fedt inde i lipoproteinerne i en blodprøve (rød linje). Modificeret fra Aru et al. [3].

kolesterol-transportpartikler, der kan inddeles i fem grupper baseret på deres densitet (se figur 1).

### Lipoproteiner som biomarkør

Kvantificering af kolesterol i blodet har stor interesse i diagnostisk medicin og ernæring, da forhøjede koncentrationer af kolesterol og triglycerider i specifikke LP'er kan relateres til en signifikant forøget forekomst af hjerte-kar-sygdomme (CVD'er) [4]. Undersøgelser af LP-partikelfordelinger i blodet har blandt andet vist en konsistent og direkte sammenhæng mellem plasma LDL og udviklingen af åreforkalkning [4]. Imidlertid kan det totale LDL-kolesteroltal ikke forudsige risikoen for koronar hjertesygdom (tilstoppede arterier) [4].

LDL/HDL-kolesterolforholdet anses i dag for at have en større forudsigelsesværdi end de enkelte LP'er [5]. På grund af den såkaldte "omvendte kolesteroltransport" kan HDL forhindre dannelsen af tilstoppede arterier, der skyldes LDL-metabolisme og dermed repræsenterer en ikke-kausal markør for CVD'er [6]. Det er desuden bevist, at personer med overvejende små LDL-partikler har større CVD-risiko end dem med større LDL-partikler [7]. Derfor er en nøjagtig kvantificering af LP-subfraktionerne et vigtigt screeningsværktøj til forebyggelse og diagnose af CVD. LP-distributionen kan også være en vigtig biomarkør for eksempel for overvægt og fejlernæring.

### Måling af lipoproteiner

Ultracentrifugering (UC) er den etablerede referencemetode til separation og dermed kvantificering af lipoproteiner [8].

## OTTO – DIGITAL SERVICE FRA BUSCH

OTTO overvåger dine vakuumpumper, overalt, når som helst.

Se tilstanden af din proces eller vakuumpumper med vores digitale service.

OTTO sender automatisk beskeder til Busch i tilfælde af forstyrrelser i din proces.

Oplev fordelene af tilstandsovervågning.

LABDAYS

Stand 41

U  
BUSCH

VACUUM SOLUTIONS

Busch Vakuumenteknik A/S  
87 88 07 77  
info@busch.dk  
www.buschvacuum.com

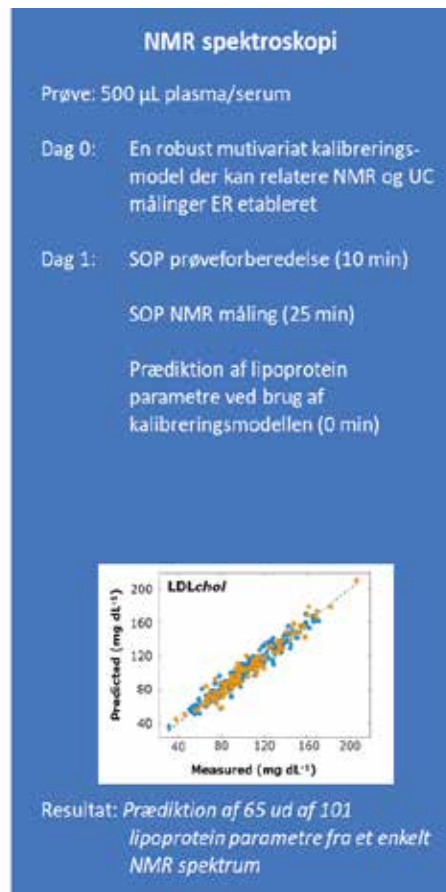
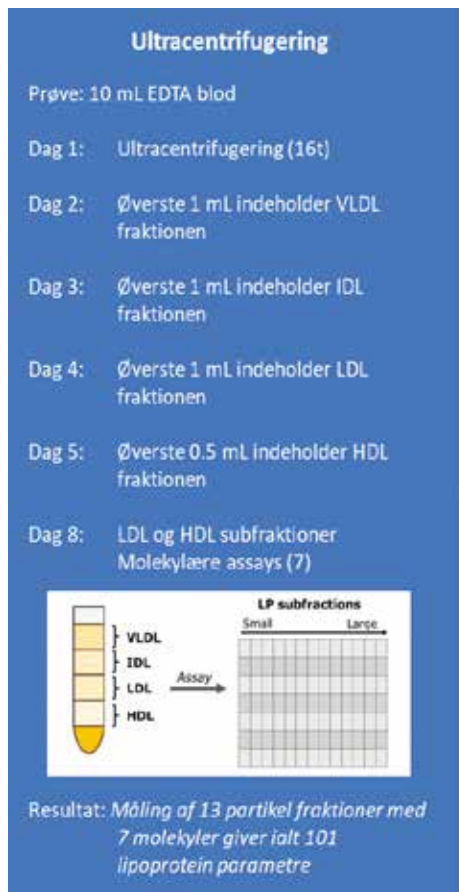
Separering af CM, VLDL, IDL, LDL og HDL opnås ved at justere densiteten af mediet i et antal centrifugeringstrin for at facilitere en sekventiel "flydning" af de individuelle lipoprotein-fraktioner [8]. Den fuldstændige adskillelse af alle lipoprotein-fraktioner kan kræve fra to til fem analysedage [9] (figur 3), hvilket begrænser anvendeligheden af metoden som et screeningsværktøj i epidemiologiske undersøgelser.

Andre metoder til adskillelse og kvantificering af LP inkluderer gelpermeation væskechromatografi (GP-HPLC) og gelelektroforese. GP-HPLC adskiller lipoproteiner på basis af partikeldiameteren, hvor små partikler har en længere elueringstid end store partikler [10], mens gelelektroforese er baseret på adskillelse og analyse af makromolekyler baseret både på deres størrelse og ladning [11]. Begge metoder er temmelig omstændige og derfor heller ikke egnede som screeningsværktøjer. En alternativ og hurtig metode til måling af lipoprotein-fraktioner er kernemagnetisk resonans (NMR) spektroskopi.

## Bestemmelse af lipoprotein-fordeling fra <sup>1</sup>H NMR-spektre

NMR-spektroskopi er fundamentalt set kvantitativ for det målte prøvevolumen, og man kan derfor kvantificere baselineopløste signaler ved simpel integration. Selv i komplekse kemiske blandinger som blod fungerer dette princip ofte. I lipoprotein-tilfældet (se figur 2) er dette imidlertid ikke muligt, da man i så fald vil kvantificere den totale mængde methylen og/eller methyl i blodet og altså ikke molekylære species. Imidlertid er de to indhyldningskurver for methyl og methylen mere end almindeligt komplekse og indeholder mange underliggende fænomener (kemisk information), der kan relateres til forskellige typer af lipoproteiner.

Da det ikke er muligt at opløse disse komplekse indhyldningskurver i bidrag fra enkelte lipoprotein species, kræves der en kalibrering til en referencemetode (UC). Til forudsigelse af disse lipoprotein-koncentrationer ud fra <sup>1</sup>H NMR-spektre er der grundlæggende blevet anvendt to metoder til kalibrering til referencemetoden, nemlig kurvetilpasning og PLS-regression (Partial Least Squares) [3,14]. Kvantificering af lipoprotein-fordeling med NMR er derfor vidt forskellig fra andre kvantitative og kvalitative NMR-applikationer, da den bygger på at analysere formen på signaler fra metyl- og metylen-grupperne. Derfor skal kravene til



Figur 3. Sammenligning af målinger af lipoproteiner med referencemetode og med den NMR-baserede prædiktionsmetode. Ultracentrifugeringsmetoden til venstre tager 5-8 dage og NMR-metoden til højre tager kun lidt over en halv time og muliggør dermed større kohorte screeninger.

NMR-reproducerbarhed strækkes til dets yderste grænse. Standard Operating Procedures (SOP), der minutløst beskriver prøveindsamling, forberedelse, måling og forbehandling, er derfor udviklet for at øge reproducerbarheden på blodanalyser på tværs af forskellige laboratorier [15]. Når disse SOP'er er udviklet, skal der etableres en multivariat kalibrering af hundredvis af prøver med tilhørende referencemålinger (UC). Først når dette kalibreringsarbejde er udført og grundigt valideret, kan man benytte den udviklede kalibreringsmodel til at bestemme lipoprotein-fordelingen i plasma ud fra et simpelt <sup>1</sup>H NMR-spektrum (figur 3).

## Udvikling af en prædiktionsmetode

Vi har i samarbejde med Bispebjerg Hospital og Institut for Idræt og Ernæring afsluttet et større studium af ældre, der var fokuseret på, om sarkopeni (aldersrelateret muskeltab) kan reduceres ved at lave fysisk træning og/eller indtage proteinsupplement (CALM-kohorte) [16]. I den forbindelse har vi foretaget en større kalibrering af <sup>1</sup>H NMR-spektre og lipoprotein-profiler (UC). Dette arbejde

er unikt på verdensplan, da det kræver et omfattende analytisk arbejde med referencemetoden UC. Vi har målt både <sup>1</sup>H NMR og UC på blodprøver af 316 sunde, primært ældre, danskere (196 kvinder og 120 mænd) med en alder på  $64,5 \pm 15$  år.

Ved at sammenholde disse målinger med Partial Least Squares (PLS) regression har det vist sig, at vi kunne udvikle prædiktionsmodeller for 65 ud af 101 mulige lipoproteiner (hovedfraktioner, subfraktioner og lipoprotein-molekyler) med en prædiktionsnøjagtighed  $Q^2$  større end 0,6 på testsæt-prøver, heraf kunne 41 prædikteres med en  $Q^2$  større end 0,8 [17]. Dette arbejde betyder, at vi nu og fremover kan prædiktere 65 lipoprotein-parametre ud fra et enkelt <sup>1</sup>H NMR-spektrum. Foreløbig har vi testet vores modeller på et uafhængigt prøvesæt fra en svensk kohorte med 85-95 procent match.

## Implementering af prædiktionsmetode i software og analytiske perspektiver

For at lette fremtidigt analytisk arbejde med LPD-prædiktioner har

vi implementeret LPD prædiktionsmodellerne i vores open access software SigMa [18], som vi bruger til processering af metabolomics prøvesæt. SigMa er skrevet i Matlab og kan downloades på <https://food.ku.dk/foodomics>. SigMa står for Signature Mapping og er en ny metode, vi har udviklet for at konvertere komplekse NMR-spektre til en kvantitativ metabolit-tabel. På denne måde kan vi både opnå en plasma metabolitprofil og en plasma lipoprotein-profil fra samme NMR-spektrum af plasma. Lipoprotein-profilering giver dermed en ekstra dimension til fremtidige metabolomics-studier såsom kostinterventionsstudier og andre typer af kliniske screenings uden ekstraomkostninger. Den eneste betingelse for at opnå den ekstra lipoprotein bonusinformation er at benytte en detaljeret SOP for <sup>1</sup>H NMR prøveforberedelse og måling.

Tak til Innovationsfonden for økonomisk støtte til denne forskning.

E-mail:

Søren B. Engelsen: [se@food.ku.dk](mailto:se@food.ku.dk)

#### Referencer

- H.A. Krebs, Annual Review of Biochemistry **1950**, 19, 409-430.
- L.C. Smith, H.J. Pownall and A.M. Gotto, Annual Review of Biochemistry **1978**, 47, 751-777.
- V. Aru, C. Lam, B. Khakimov, H.C.J. Hoefsloot, G. Zwanenburg, M.V. Lind, H. Schafer, J. van Duynhoven, D.M. Jacobs, A.K. Smilde and S.B. Engelsen, Trac-Trends in Analytical Chemistry **2017**, 94, 210-219.
- R. Carmena, P. Duriez and J.C. Fruchart, Circulation **2004**, 109, 2-7.
- J. Millán, X. Pintó, A. Muñoz, M. Zúñiga, J. Rubiés-Prat, L.F. Pallaró, L. Masana, A. Mangas, A. Hernández-Mijares, P. González-Santos, J.F. Ascaso and J. Pedro-Botet, Vasc Health Risk Manag **2009**, 5, 757-765.
- G.F. Lewis and D.J. Rader, Circulation Research **2005**, 96, 1221-1232.
- W.C. Cromwell and J.D. Otvos, Curr Atheroscler Rep **2004**, 6, 381-387.
- T.G. Redgrave, D.C.K. Roberts and C.E. West, Analytical Biochemistry **1975**, 65, 42-49.
- S. Monsonis-Centelles, H.C.J. Hoefsloot, S.B. Engelsen, A.K. Smilde and M.V. Lind, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine **2020**, 58, 103-115.
- G. Toshima, Y. Iwama and F. Kimura, **2013**.
- D.L. Sparks and M.C. Phillips, Journal of Lipid Research **1992**, 33, 123-130.
- P.A. Kroon, Journal of Biological Chemistry **1981**, 256, 5332-5339.
- J.D. Otvos, E.J. Jeyarajah, D.W. Bennett and R.M. Krauss, Clinical Chemistry **1992**, 38, 1632-1638.
- M. Petersen, M. Dyrby, S. Toubro, S.B. Engelsen, L. Nørgaard, H.T. Pedersen and J. Dyerberg, Clinical Chemistry **2005**, 51, 1457-1461.
- a) A.C. Dona, B. Jimenez, H. Schafer, E. Humpfer, M. Spraul, M.R. Lewis, J.T.M. Pearce, E. Holmes, J.C. Lindon and J.K. Nicholson, Analytical Chemistry **2014**, 86, 9887-9894; b) S.M. Centelles, H.C.J. Hoefsloot, B. Khakimov, P. Ebrahimi, M.V. Lind, M. Kristensen, N. de Roo, D.M. Jacobs, J. van Duynhoven, C. Gannet, F. Fang, E. Humpfer, H. Schafer, M. Spraul, S.B. Engelsen and A.K. Smilde, Analytical Chemistry **2017**, 89, 8004-8012.
- R.L. Bechshoft, S. Reitelseder, G. Hojfeldt, J.L. Castro-Mejia, B. Khakimov, H.F. Bin Ahmad, M. Kjaer, S.B. Engelsen, S.M.B. Johansen, M.A. Rasmussen, A.J. Lassen, T. Jensen, N. Beyer, A. Serena, F.J.A. Perez-Cuetto, D.S. Nielsen, A.P. Jespersen and L. Holm, Trials **2016**, 17, 17.
- B. Khakimov, H.C.J. Hoefsloot, N. Mobaraki, V. Aru, M.V. Lind, L. Holm, J. L. Castro-Mejia, D.S. Nielsen, A.K. Smilde and S.B. Engelsen, Analytical Chemistry **2022**, 94, 628-636.
- B. Khakimov, N. Mobaraki, A. Trimigno, V. Aru and S.B. Engelsen, Analytica Chimica Acta **2020**, 1108, 142-151.

  
**SCION**  
INSTRUMENTS

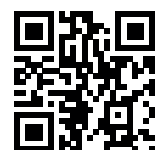
A Techcomp Company

## PREMIUM CHROMATOGRAPHY

Boost productivity and generate data confidently with our premium gas and liquid chromatography solutions.



Please contact SAMSI, our regional distributor  
Email: [samsi@samsi.no](mailto:samsi@samsi.no) | Phone: +4735975600  
[www.samsi.no](http://www.samsi.no)



SCAN FOR MORE  
INFORMATION

 [scioninstruments.com](http://scioninstruments.com)