

Klinische Chemie

Die Bestimmung des LDL- bzw. beta-Cholesterin im Serum

Klinische Bedeutung und methodische Möglichkeiten

D. Seidel, V. Armstrong und P. Cremer

Abteilung Klinische Chemie der Universität Göttingen

1. Klinische Bedeutung des Parameters

Statistischen Erhebungen zufolge müssen die Atherosklerose und ihre Folgekrankheiten, darunter insbesondere die koronare Herzkrankheit und der Herzinfarkt als häufigste Todesursachen in westlichen Industrienationen angesehen werden [1, 27]. Die genannten Krankheiten sind dementsprechend nicht nur ein einschneidendes Ereignis für den einzelnen Betroffenen und seine Angehörigen, sie stellen auch einen Kostenfaktor von überragender Bedeutung im Gesundheitswesen und damit eine Belastung für die Allgemeinheit dar [1]. Unter diesen Gesichtspunkten erstaunt es nicht, daß atherosklerotische Folgekrankheiten neben den Krebsleiden in den Mittelpunkt präventivmedizinischer Bemühungen gerückt sind.

Windhaus [32] beschrieb vor ca. 75 Jahren erstmals eine Anreicherung von Cholesterin und Cholesterinester in atheromatösen Plaques beim Menschen und leitete damit die zielgerichtete experimentelle Atheroskleroseforschung ein. Seitdem haben zahlreiche epidemiologische und klinische Studien eindrucksvoll deutlich gemacht, daß bei Vorliegen einer Hypercholesterinämie ein erhöhtes Risiko für die frühzeitige Manifestation atherosklerotischer Gefäßschäden besteht, wobei die Gefährdung mit dem Schweregrad und der Dauer der Fettstoffwechselstörung zunimmt [17, 19, 22, 23]. Die hohe Korrelation zwischen der Cholesterinkonzentration im Serum und der frühzeitigen Manifestation einer klinisch faßbaren Atherosklerose, speziell einer Koronarsklerose, wird bedingt durch die Tatsache, daß bis zu 80% des Gesamtcholesterins in Form der sog. low density- oder β -Lipoproteine transportiert werden und damit Bestandteil jener Partikel sind, die heute als bedeutsamste atherogene Komponente im Fettstoffwechsel gelten [25].

Die low density Lipoproteine oder LDL (Abb. 1) sind definiert als Lipoproteine mit einer Dichte zwischen d 1,006 und 1,063 g/ml. Ihre Zusammensetzung ist weitgehend konstant: Sie beste-

hen zu 45% aus Cholesterin, zu 23% aus Phospholipide, zu 10% aus Triglyceriden und zu 22% aus Apo B¹⁰⁰, dem Proteinanteil (Apoprotein) dieser Partikel. LDL zeigen in Agarose eine elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit, die derjenigen der β -Globuline des Plasmas entspricht. Neben LDL kann daher als weitgehend synonyme Bezeichnung auch der Begriff β -Lipoproteine verwendet werden [25].

LDL entstehen im Plasma unter Einwirkung verschiedener lipolytischer Enzyme aus den triglyceridreicheren very low density Lipoproteinen (VLDL), die von der Leber an das Plasma abgegeben werden [8,25]. Die Elimination der LDL aus dem Plasma [8, 9, 25] erfolgt überwiegend durch Leberparenchymzellen und zwar mittels spezifischer Oberflächenrezeptoren, der sog. Apo B/E- oder LDL-Rezeptoren. Nur zu einem relativ geringen Teil beteiligen sich unter physiologischen Bedingungen die anderen Körpergewebe an der LDL-Extraktion aus dem Plasma. Auch dort erfolgt die LDL-Aufnahme vorwiegend über den *B/E-Rezeptormechanismus*. Dieser ist *saturierbar*, d.h. abhängig vom Cholesteringehalt und -bedarf der Zelle. Nimmt der intrazelluläre Cholesteringehalt zu, kommt es zu einer verminderten Rezeptorbildung und dadurch zu einer verlangsamten LDL- bzw.

LDL/ β - Lipoprotein

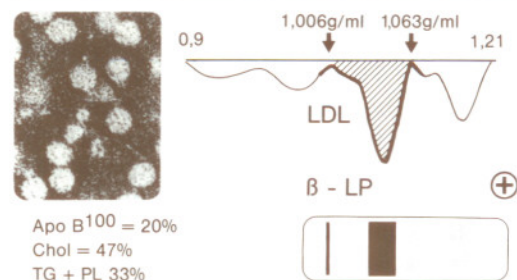


Abb. 1. Low density Lipoproteine (LDL) bzw. β -Lipoproteine: Elektronenmikroskopisches Bild, Zusammensetzung und wichtigste physikochemische Eigenschaften (Dichte, elektrophoretische Mobilität)

Cholesterinaufnahme durch die Zelle. Durch diese Autoregulation sind die Zellen vor einer Cholesterinübersättigung geschützt. Bei einigen Zellklassen, darunter das Monozyten/Makrophagensystem sowie die glatten Muskelzellen der Gefäßwand, erfolgt die LDL-Aufnahme über alternative Mechanismen, den sog. Scavenger-Pathway. Diese *nicht-saturierbaren Scavengerwege* für LDL werden immer dann verstärkt beschritten, wenn die Aktivität der spezifischen Aufnahmemechanismen eingeschränkt ist. Der daraus resultierende Anstieg der LDL-Konzentration im Plasma ist verbunden mit der Gefahr einer Cholesterinübersättigung der in den Scavenger-Pathway einbezogenen Zellsysteme bzw. Gewebe. Somit bedeutet eine Einschränkung der Apo B/E-Rezeptoraktivität stets ein erhöhtes Risiko für atherosklerotische Gefäßveränderungen [8, 9, 25].

Grundsätzlich kann eine reduzierte Apo B/E-Rezeptoraktivität zwei Ursachen haben [8, 25]: Es kann sich um genetisch determinierte Defekte und eine dadurch bedingt verminderte Fähigkeit zur Ausbildung funktionstüchtiger Rezeptoren handeln oder aber um eine relative, auch erworbene Insuffizienz des Apo B/E-Rezeptorsystems z.B. durch ein Überangebot an LDL im Plasma. Die sicher folgenschwerste Form einer reduzierten Leistung des Apo B/E-Rezeptorsystems findet sich bei der familiären Hyper- β -Lipoproteinämie (8). Homozygot von dieser Krankheit betroffene Patienten zeigen keinerlei oder nur eine minimale Apo B/E-Rezeptorfunktion; ihre LDL- und demzufolge ihre Gesamtcholesterinkonzentration im Serum ist vier- bis fünffach erhöht. Eine klinisch manifeste Koronarsklerose tritt in der Regel vor dem 20. Lebensjahr ein. Die weit überwiegende Mehrzahl dieser Patienten stirbt bisher an den Folgen der Gefäßveränderungen vor dem 30. Lebensjahr. Bei heterozygot Erkrankten ist die Apo B/E-Rezeptoraktivität auf ca. 50% der Norm reduziert. Hier finden sich zwei- bis dreifach über der Norm liegende LDL- und Gesamtcholesterinspiegel. Auch die Patienten dieser Gruppe sind mit einem hohen Risiko für koronarsklerotische Veränderungen und entsprechende Folgekrankheiten behaftet. Viel häufiger als die autosomal dominant vererbte, besonders folgenschwere, letztlich aber seltene familiäre Hyper- β -Lipoproteinämie, sind polygen induzierte Formen von Hypercholesterinämien [8, 16, 22, 25]. Auch hier besteht in der Regel eine genetisch determinierte Neigung zu erhöhten LDL(β -Lp)-Spiegeln im Serum, doch entwickelt sich eine manifeste Fettstoffwechselstörung erst durch Einwirkung zusätzlicher Faktoren, die zumeist den Bereich der Lebensgewohnheiten und Lebensbedingungen betreffen (z.B. Übergewicht, Bewegungsmangel, einseitige Ernährung etc.). Auch diese sehr verbreiteten Formen der Hyper- β -Lipoproteinämie (20–25% der Bevölkerung in der Bundesrepublik

[26]) gehen mit einem überdurchschnittlich hohen koronaren Risiko einher.

Die ausgeprägte atherogene Wirkung erhöhter LDL(β -Lp)-Spiegel ist durch umfangreiche epidemiologische Studien sowie zahlreiche experimentelle Befunde auf zellulärer und molekularer Ebene belegt [8, 9, 12, 16, 17, 25]. Hiernach stellen LDL ein zentrales Stimulans für mehrere, in der Atherogenese bedeutsame Mechanismen dar. Sie induzieren oder begünstigen wichtige Prozesse der Krankheit auf mehreren Ebenen und proportional ihrer Plasmakonzentration [8, 9, 25]. So sind Zusammenhänge zwischen erhöhten LDL-Konzentrationen und dem vermehrten Auftreten morphologisch faßbarer Endothelschäden gezeigt worden. Diesen gehen funktionelle Endothelbeeinträchtigungen mit Störungen der Thrombozytenresistenz des Endothels, mit vielfältigen Störungen von Rezeptorfunktionen und Membranpermeabilitätsstörungen voraus. Endotheldefekte bedeuten eine Zerstörung der natürlichen Barriere zwischen Blutbestandteilen, insbesondere Lipoproteinen, Thrombozyten sowie Makrophagen und den subendothelialen Schichten der Gefäßwand und gelten als obligate Voraussetzung für den Beginn atheromatöser Gefäßwandveränderungen. Neuere Befunde zeigen zudem, daß LDL durch Wechselwirkungen mit Endothelzellen chemisch und strukturell so modifiziert werden können, daß sie eine abnorm hohe Affinität zu Monozyten und glatten Muskelzellen entwickeln. Weiterhin sind direkte Wechselwirkungen zwischen LDL und Thrombozyten sowie zwischen LDL und Monozyten pathogenetisch von Bedeutung. Sie beeinflussen nicht nur den Prostaglandinstoffwechsel, sondern die Adhäsions- und Aggregationsbereitschaft dieser Zellklassen. Unter dem Einfluß erhöhter LDL-Konzentrationen kommt es zur vermehrten Freisetzung vasoaktiver Plättcheninhaltsstoffe, wie ADP, Serotonin und des Platelet-Derived-Growth-Factors (PDGF), der die proliferativen Vorgänge in der Gefäßwand während der Atherogenese hauptverantwortlich unterhält.

Zusammengefaßt kann heute kein Zweifel mehr darüber bestehen, daß von erhöhten Plasma-LDL-Konzentrationen eine direkte endothelschädigende Wirkung zu erwarten ist, die mindestens derjenigen einer Reihe anderer Noxen (Hypertonie, Hyperinsulinämie, Viren, Endotoxine, Immunkomplexe, Kohlenmonoxyd etc.) vergleichbar ist, und daß das in einen atherosklerotischen Plaque zur Ablagerung gelangte Cholesterin ursprünglich in Form von LDL-Cholesterin im Plasma vorlag.

Obgleich die Rolle der low density- bzw. β -Lipoproteine in der Atherogenese und damit für die Einschätzung des individuellen Atheroskleroserisikos spätestens seit den 70iger Jahren bekannt ist, und obgleich schon vor mehr als 30 Jahren

Techniken zur differenzierten Darstellung des Lipoproteinsystems (Ultrazentrifugation, Elektrophorese) entwickelt wurden, ist es erst in den letzten Jahren gelungen, diese pathogenetisch so entscheidende Fettstoffwechselkomponente auch unter Anwendung routinetauglicher Laborverfahren mit ausreichender analytischer Zuverlässigkeit direkt zu quantifizieren. Neuere epidemiologische Studien, die sich dieser diagnostischen Möglichkeiten bedient haben [2, 11, 12, 19], zeigen erwartungsgemäß, daß der direkten LDL- bzw. β -Cholesterinmessung unter allen Einzelparametern die höchste klinische Aussagekraft bei der Unterscheidung von koronarkranken und koronargesunden Personen zukommt. Die Aussagekraft dieses Einzelparameters kann allerdings noch durch zusätzliche Messung der VLDL (prä- β)-Cholesterinkonzentration, der LP(a)-Konzentration sowie durch die Verhältnisbildung von LDL/HDL- bzw. β /a-Cholesterin verstärkt werden [2, 5, 10–13, 25]. Basierend auf umfassenden eigenen, in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Kardiologie und Pulmologie der Medizinischen Universitätsklinik Göttingen erstellten Lipoproteinanalysen an ca. 3000 koronarangiographierten Patienten muß ein überdurchschnittliches koronares Risiko bei folgenden Lipoproteinkonstellationen angenommen werden [2, 5, 10–12, 25]:

- bei einem eindeutig erhöhten LDL-Spiegel (absoluter Hyper- β -Lipoproteinämie): LDL-Cholesterin > 180 mg/dl
- bei einem relativ erhöhten LDL-Spiegel (relative Hyper- β -Lipoproteinämie): LDL-Cholesterin 140–180 mg/dl bei gleichzeitigem LDL/HDL-Cholesterinverhältnis > 4,0
- bei einem erhöhten VLDL-Cholesterinspiegel (Hyper-prä- β -Lipoproteinämie): VLDL-Cholesterin > 40 mg/dl
- bei erhöhten LP(a)-Konzentrationen (> 40 mg/dl)
- bei Auftreten abnormer, intermediärer Lipoproteine (IDL, β -VLDL) im Plasma
- evtl. bei Persistieren von Chylomikronenabbauprodukten (Remnants) unter Nüchternbedingungen.

Die relative und die absolute Hyper- β -Lipoproteinämie sind die bei weitem häufigsten unter den genannten Formen pathologischer, mit erhöhtem Koronarrisiko einhergehender Lipoproteinmuster [26]. Sie finden sich bei ca. 20–25% der Probanden in einer sonst gesunden Allgemeinbevölkerung. Daher und aufgrund der hohen Atherogenität der LDL (β -Lp) sind relativ oder absolut erhöhte Serumkonzentrationen dieser Partikel als der relevanteste Risikofaktor für die Koronarsklerose anzusehen. Im präventivmedizinischen Bereich ergibt sich hieraus die Forderung nach einer direkten Quantifizierung der LDL-(β -Lp)-Konzentration

des Serums bereits bei Routineuntersuchungen, zumindest dann, wenn der Gesamtcholesterinspiegel im Bereich zwischen 200 und 280 mg/dl liegt.

Der vorliegende Übersichtsartikel soll im Folgenden über die heutigen methodischen Möglichkeiten informieren sowie Vor- und Nachteile der verschiedenen Techniken gegenüberstellen.

2. Verfahren zur Quantifizierung des LDL- bzw. β -Cholesterin im Serum

2.1. Ultrazentrifugation

Das klassische Verfahren zur Lipoproteinquantifizierung beruht auf einer Trennung der verschiedenen Fraktionen nach ihrer Dichte. Üblicherweise werden insgesamt drei Ultrazentrifugationsläufe von 24 Stunden Dauer zur Isolierung der drei Hauptlipoproteinfraktionen nacheinander durchgeführt (VLDL $d < 1,006$ g/ml; LDL $d 1,006$ – $1,063$ g/ml; HDL $d 1,063$ – $1,21$ g/ml). Nach Korrektur auf das Ausgangsvolumen kann dann in jeder einzelnen Fraktion eine chemisch definierte Komponente, in der Regel Cholesterin, quantifiziert werden. Dieses aufwendige und daher auch vergleichsweise unpräzise, mehrere Tage in Anspruch nehmende Verfahren ist zur Bestimmung des Lipoproteinmusters an einer größeren Zahl von Serumproben meist nicht praktikabel. Auf Empfehlung der Lipid Research Clinics der USA wird daher heute die Ultrazentrifugation zum Zwecke der Vereinfachung mit bestimmten Präzipitationstechniken kombiniert [18]. Hiernach ist dann nur noch ein Ultrazentrifugationslauf von 24 h Dauer erforderlich. Die Lipoproteine mit einer Dichte unter 1,006 g/ml (VLDL und ggf. Chylomikronen) gelangen hierbei in den Überstand und werden so von dem aus LDL, HDL und anderen Serumproteinen bestehenden Unterstand abgetrennt. Der Unterstand wird auf das Ausgangsvolumen korrigiert, anschließend wird das darin enthaltene Cholesterin (LDL-Cholesterin + HDL-Cholesterin) gemessen. Durch Mischung des Unterstandes mit einem geeigneten Fällungsreagenz (Heparin/MnCl₂ oder Phosphorwolframsäure/MgCl₂) werden dann die LDL präzipitiert, während die HDL in Lösung bleiben. Durch die nachfolgende Quantifizierung des Cholesterin am Fällungsüberstand ergibt sich der HDL-Cholesterinwert. Unter Berücksichtigung des Vollserumcholesterinwertes, der Cholesterinkonzentration in der Fraktion $d > 1,006$ g/ml sowie des HDL-Cholesterinwertes können durch Aufrechnung die LDL-, VLDL- und HDL-Cholesterinwerte ermittelt werden.

VLDL-Chol. = Gesamtcholesterin abzüglich Unterstandcholesterin

HDL-Chol. = Chol. im Filtrat nach LDL-Präzipitation an dem durch Ultrazentrifugation erhaltenen $d > 1,006$ g/ml Unterstand

LDL-Chol. = Chol. des Unterstandes nach Ultrazentrifugation abzüglich HDL-Chol.

Zwar bedeutet dieses sog. LRC-Verfahren gegenüber der ursprünglichen Ultrazentrifugationstechnik eine erhebliche Erleichterung, da nur ein Ultrazentrifugationslauf erforderlich wird, doch ist es für einen Einsatz zur routinemäßigen Lipoproteinquantifizierung u.E. noch immer zu aufwendig. Die LRC-Technik findet heute hauptsächlich Verwendung als Referenzverfahren, auf das sich neu entwickelte Methoden zur Lipoproteinquantifizierung zu beziehen haben.

2.2. Quantitative Lipoproteinelektrophorese [29]

Das zweite klassische Verfahren zur Auftrennung der Lipoproteinfraktionen neben der Ultrazentrifugation ist die Elektrophorese. Hierbei werden die Lipoproteinklassen nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld differenziert. Zwischen den Dichteklassen und den elektrophoretischen Fraktionen gibt es weitgehende Übereinstimmungen. Nach elektrophoretischer Trennung unterscheidet man β -Lipoproteine (weitgehend entsprechend den LDL), prä- β -Lipoproteine (weitgehend entsprechend den VLDL) und α -Lipoproteine (weitgehend entsprechend den HDL) sowie Chylomikronen, die an der Auftragstelle verharren [14, 25]. Bei den ursprünglich entwickelten elektrophoretischen Techniken wurden die Lipoproteine nach Auftrennung über ihre Lipidanteile angefärbt. Diese Vorgehensweise erlaubte keine reproduzierbare und verwertbare quantitativ-densitometrische Messung und Auswertung der Elektropherogramme; sie ermöglicht lediglich die semi-quantitative Typisierung von Fettstoffwechselstörungen nach dem Frederickson-Schema [14]. Mit der Entdeckung, daß sich die Lipoproteine des Plasmas, trotz sehr unterschiedlicher Komposition in ihrem Lipid- und Proteinanteil, quantitativ und reproduzierbar durch Polyanionen auch nach elektrophoretischer Trennung in Gelen präzipitieren lassen [29], war die Grundlage für die quantitative Lipoproteinelektrophorese gegeben. Damit wurde ein ursprünglich nur zur Trennung der Lipoproteine geeignetes Basisverfahren (Elektrophorese) zu einer quantitativ auswertbaren Technik weiterentwickelt. Der Vorteil der quantitativen Lipoproteinelektrophorese gegenüber den anderen Meßverfahren besteht u.a. darin, daß hierbei die Quantifizierung der Serumkonzentration von β -(LDL)Cholesterin, prä- β -(VLDL)Cholesterin und α -(HDL-) Cholesterin in nur einem Arbeitsgang erfolgt und zudem das Vorhandensein von Chylomikronen und abnormen Lipoproteinfraktionen erkannt werden kann [10, 29].

In ausgedehnten Vergleichsreihen [10] gegen die zuvor geschilderte Ultrazentrifugationstechnik

Tabelle 1. β -Cholesterin Bestimmungen mittels der quantitativen Lipoproteinelektrophorese: Vergleich mit der LDL-Cholesterinquantifizierung gemäß den LRC-Empfehlungen (Referenzverfahren) und verschiedenen Fällungstechniken zur LDL-Cholesterinmessung. Angegeben sind die Korrelationskoeffizienten (r) und die Werte der Regressionsgleichungen ($y = ax + b$) für die zwischen dem quantitativ elektrophoretischen Verfahren (y) und den Vergleichsmethoden (x) ermittelten Korrelationen

Vergleichsverfahren (x)	n	r	$y = ax + b$
LDL-Chol. (LRC)	107	0,98	$y = 0,98x + 1$
LDL-Chol. (Dex)	771	0,96	$y = 0,9x + 0,47$
LDL-Chol. (Hep)	107	0,97	$y = 0,96x + 1,92$

Abkürzungen für verschiedene Verfahren zur LDL-Cholesterinbestimmung: LRC = Ultrazentrifugationstechnik nach LRC-Richtlinien; Dex = Fällungsverfahren mit Dextransulfat; Hep = Fällungsverfahren mit Heparin bei saurem pH;

nach LRC-Richtlinien konnte belegt werden, daß das quantitativ auswertbare elektrophoretische Verfahren zur Quantifizierung der drei regulären Lipoproteinfraktionen des Nüchternserums, darunter insbesondere auch der LDL, sehr gut geeignet ist (Tabelle 1). Die quantitative Lipoproteinelektrophorese erwies sich als eine Methode von guter Richtigkeit und Präzision (VK für β -Chol. 3,6% von Tag zu Tag, 2,5% in der Serie) [29]. Diese Aussage hat selbstverständlich nur für das beschriebene Verfahren Gültigkeit, bei dem eine elektrophoretische Auftrennung der Lipoproteine in Agarose mit einer nachfolgenden *Polyanionenpräzipitation* kombiniert wird. Der Hinweis erscheint notwendig, da auch noch in neuerer Zeit [7] Elektrophoresetechniken mit *Anfärbung* der Lipoproteinfraktionen zu Unrecht als quantitatives Verfahren bezeichnet und unter diesem Aspekt geprüft werden.

Seit einigen Jahren ist ein kommerziell hergestellter Testkit zur Durchführung einer quantitativ auswertbaren Lipoproteinelektrophorese nach den oben beschriebenen Prinzipien auf dem Markt erhältlich (Lipidophor All In System, Immuno AG, Wien), der alle Anforderungen eines Routinelaboratoriums erfüllt.

2.3. Fällungstechniken zur LDL-Cholesterinbestimmung

2.3.1. Fällung mit hochmolekularem Dextransulfat [4].

Die Partikel der LDL-Fraktion bilden im Unterschied zu anderen Lipoproteinen mit hochmolekularem Dextransulfat unlösliche Aggregate. Durch Vermischung von Serumproben mit geeigneten Dextransulfatlösungen ist es möglich, LDL selektiv aus dem Serum zu präzipitieren und HDL sowie VLDL in Lösung zu belassen. 100 μ l Serum werden mit der 10-fachen Menge des Fällungsreagenz gemischt und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der ausgefällte LDL-

Dextransulfatkomplex 10 min. bei 5000 RPM abzentrifugiert und das Überstandscholesterin (HDL-Chol. + VLDL-Chol.) mit einem herkömmlichen, enzymatischen Testkit (z.B. CHOD-PAP, Boehringer Mannheim) gemessen. Aus der Differenz zwischen dem Gesamtcholesterinwert des Serums und dem so ermittelten Überstandscholesterin ergibt sich der LDL-Cholesterinwert.

Das Verfahren wird bei hohen Spiegeln freier Fettsäuren im Untersuchungsmaterial gestört, es liefert hier falsch niedrige Meßergebnisse [4]. Dieser Umstand ist besonders bei einer Heparin-Therapie zu beachten.

Ein kommerziell hergestellter Testkit zur Bestimmung des LDL-Cholesterin nach dem Prinzip der Dextransulfatfällung ist unter der Bezeichnung Quantolip-LDL (Immuno AG, Wien) erhältlich. Mit diesem Bestimmungsverfahren erzielten wir Variationskoeffizienten (VK) von 3,7% für die Präzision von Tag zu Tag und von 2,3% für die Präzision in der Serie.

2.3.2. Fällung mit Polyvinylsulfat [6]. Bei diesem Verfahren erfolgt die Fällung der LDL-Partikel durch Komplexbildung mit Polyvinylsulfat. 200 µl Serum werden mit 100 µl einer Polyvinylsulfatlösung gemischt und 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die entstandenen LDL-Polyvinylsulfatkomplexe werden abzentrifugiert, das Überstandscholesterin (VLDL-Chol. + HDL-Chol.) mit enzymatischen Testkits zur Cholesterinbestimmung quantifiziert. Die Differenz zwischen Überstandscholesterin und Vollserumcholesterin ergibt den LDL-Cholesterinwert.

Ein kommerziell hergestellter Testkit zur Bestimmung des LDL-Cholesterin nach dem Prinzip der Polyvinylsulfatfällung wird von der Firma Boehringer Mannheim angeboten. Mit diesem Bestimmungsverfahren erzielten wir VK-Werte von 3,7% für die Präzision von Tag zu Tag und von 2,6% für die Präzision in der Serie.

2.3.3. Fällung mit polyzyklischen, oberflächenaktiven Anionen. LDL-Partikel können auch mit Hilfe polyzyklischer, oberflächenaktiver Anionen ausgefällt werden. Dabei werden 50 µl Serum mit 1000 µl Fällungsreagenz gemischt und 30 min. bei 4° C inkubiert. Der entstandene Komplex wird anschließend abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgezogen und verworfen. Das entstandene, aus LDL-Partikeln bestehende Präzipitat wird durch Inkubation mit einer Citratlösung (10 min. bei 37°) wieder aufgelöst. Anschließend kann daran der LDL-Cholesterinwert mit Hilfe eines üblichen, enzymatischen Testkits zur Cholesterinbestimmung direkt quantifiziert werden.

Ein kommerziell hergestellter Testkit zur Bestimmung des LDL-Cholesterin nach Fällung mit polyzyklischen, oberflächenaktiven Anionen wird

von der Firma Bio-Merieux, Frankreich angeboten. Mit diesem Testverfahren erzielten wir VK-Werte von 4,4% für die Präzision von Tag zu Tag und von 2,8% für die Präzision in der Serie.

2.3.4. Fällung mit Heparin bei saurem pH-Wert [30]. Eine selektive Fällung der LDL-Partikel des Serums ist möglich mit Hilfe von Heparin bei saurem pH-Wert ohne Zusatz von zweiwertigen Metallionen. Bei dieser Technik werden 100 µl Serum mit 1000 µl Fällungsreagenz gemischt, welches aus Heparin und einer Pufferlösung mit saurem pH-Wert besteht. Das Reaktionsgemisch wird 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abzentrifugation des gefällten LDL-Heparinkomplexes wird wiederum das Überstandscholesterin (VLDL-Chol. + HDL-Chol.) gemessen. Aus der Differenz zwischen Vollserumcholesterin und Überstandscholesterin ergibt sich der LDL-Cholesterinwert.

Auf dem Markt wird ein kommerziell hergestellter Testkit zur Bestimmung des LDL-Cholesterin nach dem Prinzip der Heparinfällung bei saurem pH-Wert von der Firma Merck, Darmstadt, angeboten. Mit diesem Testverfahren erzielten wir VK-Werte von 4,0% für die Präzision von Tag zu Tag und von 3,1% für die Präzision in der Serie.

2.4. Berechnung des LDL-Cholesterin mit Behelfsformeln

Die bei der Ultrazentrifugationstechnik nach LRC-Richtlinien (s. Abschn. 2.1.) auf die Serumfraktion mit der Dichte $d > 1,006$ g/ml angewandten Fällungsreagenzien, die dort LDL fällen und HDL im Überstand belassen, können im Prinzip auch auf Vollserum angewandt werden. Sie präzipitieren hier jedoch nicht selektiv LDL, sondern LDL und VLDL. HDL verbleiben im Überstand. Die Quantifizierung des Überstandscholesterin ergibt das HDL-Cholesterin. Hieran kann sich eine rechnerische Ermittlung des LDL-Cholesterin mit einer Behelfsformel (nach Friedewald) anschließen [15], die auf der Annahme beruht, daß die Division der Nüchterntriglyceridkonzentration durch fünf (TG/5) näherungsweise den VLDL-Cholesterinwert ergibt. Unter dieser Voraussetzung erlaubt die Gleichung $\text{LDL-Cholesterin} = \text{Gesamtcholesterin} - \text{TG}/5 - \text{HDL-Cholesterin}$ eine Abschätzung des LDL-Cholesterinwertes. Eigene Untersuchungsergebnisse [10] die zwischenzeitlich auch von anderen Autoren bestätigt wurden [31], zeigen jedoch, daß korrektere Ergebnisse erhalten werden, wenn statt TG/5 in die Gleichung TG/6,5 eingesetzt wird. Zudem erwies sich die LDL-Cholesterinbestimmung nach der Friedewald-Rechenformel bzgl. Präzision dem quantitativ elektrophoretischen Verfahren ebenso wie den Techniken zur selektiven LDL-Fällung als deutlich unterlegen. Die Richtigkeit des

Verfahrens leidet unter der Tatsache, daß schon geringe Mengen Chylomikronen, z.B. bei nicht strenger Einhaltung von Nüchternbedingungen, zwangsläufig zu falsch niedrigen LDL-Cholesterinergebnissen führen müssen. Trotz dieser Mängel kann unter streng experimentellen Bedingungen und bei Triglyceridwerten unter 300 mg/dl eine relativ gute Übereinstimmung der LDL-Cholesterinrechnung nach Friedewald mit der Ultrazentrifugation nach LRC-Richtlinien erreicht werden. Hingegen zeigte sich, daß bei routinemäßigen Reihen- und Screeninguntersuchungen der Nüchternzustand der Patienten häufig unzureichend [10] und eine LDL-Cholesterinberechnung nach dem geschilderten Prinzip daher unzuverlässig und nicht aussagefähig ist. Angesichts wesentlich geeigneterer Techniken zur LDL-Cholesterinquantifizierung halten wir die Anwendung der Friedewaldformel bei routinemäßigen Fettstoffwechseluntersuchungen für obsolet.

3. Methodenvergleich

3.1. LDL-Präzipitationsverfahren zur LRC-Methode

Besonders interessant erscheint die Bewertung der Richtigkeit für die vier in Abschnitt 2.3. geschilderten Techniken zur selektiven LDL-Fällung, da diese unter den als brauchbar geschilderten Methoden zur LDL-Quantifizierung die am wenigsten aufwendigen sind. In einer Untersuchungsreihe quantifizierten wir daher LDL-Cholesterin an 122 Serumproben mit allen vier Fällungstechniken und stellten die Ergebnisse denen des Referenzverfahrens (Ultrazentrifugation nach LRC-Richtlinien) gegenüber. Die dabei ermittelten Korrelationskoeffizienten und Werte der Regressionsgeraden sind in Tabelle 2 wiedergegeben und zwar sowohl für die Gesamtheit aller untersuchten Proben (a), wie auch geschichtet nach der Serumtriglyceridkonzentration (b-d). Für alle vier Fällungstechniken ergaben sich gute bis sehr gute Korrelationen mit der Referenzmethode. Das beste Ergebnis zeigte hierbei die Dextransulfatfällung. Die schwächsten Korrelationskoeffizienten wurden für die LDL-Fällung mit Heparin im sauren Milieu ermittelt. Hierfür waren nicht einzelne Ausreißer sondern eine generell etwas breitere Streuung der Ergebnisse um die durch das Referenzverfahren vorgegebenen Werte verantwortlich. Für die LDL-Fällung mit Hilfe polyzyklischer, oberflächenaktiver Anionen fanden sich zwar sehr gute Korrelationskoeffizienten beim Vergleich mit der Ultrazentrifugationsmethode, doch zeigen die Werte der Regressionsgerade, daß die Ergebnisse deutlich höher als die des Referenzverfahrens lagen. Dies entspricht den Befunden anderer Autoren [20]. Demgegenüber konnte mit den drei anderen Fäl-

Tabelle 2. Richtigkeit verschiedener Präzipitationstechniken zur LDL-Cholesterinbestimmung im Vergleich mit dem Referenzverfahren (Ultrazentrifugation nach LRC-Richtlinien): Ergebnisse einer Versuchsreihe mit 122 Serumproben. Angegeben sind Korrelationskoeffizienten (r) und die Werte der Regressionsgleichungen ($y = ax + b$) für die zwischen den verschiedenen Fällungsverfahren (y) und der LRC-Technik (x) ermittelten Korrelationen

Fällungstechnik (y)	n	r	$y = ax + b$
a) Alle Serumproben, unabhängig von der Triglycerid (TG) Konzentration			
Dextransulfat	122	0,97	$y = 1,08x - 6,6$
Polyvinylsulfat	122	0,97	$y = 1,11x - 5,9$
Polyzyklische Anionen	122	0,96	$y = 1,21x - 3,0$
Heparin	122	0,94	$y = 1,00x + 1,1$
b) Serumproben mit TG < 100 mg/dl			
Dextransulfat	22	0,98	$y = 0,99x - 3,1$
Polyvinylsulfat	22	0,98	$y = 1,00x + 1,2$
Polyzyklische Anionen	22	0,98	$y = 1,12x + 2,7$
Heparin	22	0,96	$y = 0,93x - 0,5$
c) Serumproben mit TG 100–250 mg/dl			
Dextransulfat	74	0,98	$y = 1,10x - 8,8$
Polyvinylsulfat	74	0,98	$y = 1,14x - 9,2$
Polyzyklische Anionen	74	0,96	$y = 1,26x - 10,8$
Heparin	74	0,95	$y = 1,03x - 3,98$
d) Serumproben mit TG > 250 mg/dl			
Dextransulfat	26	0,98	$y = 1,05x + 3,2$
Polyvinylsulfat	26	0,97	$y = 1,07x + 2,6$
Polyzyklische Anionen	26	0,97	$y = 1,17x + 14,1$
Heparin	26	0,95	$y = 0,95x + 21,2$

lungstechniken eine gute Annäherung an die Idealgerade $Y = X$ erzielt werden.

Das bisher für die Gesamtzahl aller 122 untersuchten Serumproben geschilderte Bild verschiebt sich nicht, wenn Vergleiche zwischen den Fällungsverfahren und der Referenzmethode in mehreren, nach dem Serumtriglyceridwert geschichteten Untergruppen angestellt werden. Auch bei Triglyceridwerten über 250 mg/dl scheinen Richtigkeit und Präzision der Präzipitationstechniken nicht wesentlich negativ beeinflusst zu sein. Von anderen Autoren [20] wurde allerdings beschrieben, daß bei ausgeprägten Triglyceriderhöhungen (> 500 mg/dl) einige Fällungsverfahren zu falsch hohen LDL-Cholesterinwerten führen können.

Zur Spezifität der Fällungstechniken sei angemerkt, daß das Dextransulfatverfahren neben den LDL auch das LDL-ähnliche Lipoprotein LP(a) vollständig fällt [4]. Wie sich die anderen Verfahren bzgl. des LP(a) verhalten, ist bislang nicht bekannt. Es ist anzunehmen, daß auch sie dieses Lipoprotein mitpräzipitieren. Der mit Hilfe der Fällungsverfahren ermittelte LDL-Cholesterinwert schließt also wohl meist auch das LP(a)-Cholesterin mit ein. Eine relevante Verfälschung des Meßergebnisses ergibt sich hierdurch jedoch nur selten, da die LP(a)-Cholesterinkonzentration in der überwiegenden Mehrheit der Fälle deutlich unter 10 mg/dl

liegt [5]. Methodenvorgegeben geht das LP(a)-Cholesterin im übrigen auch in die LDL-Cholesterinbestimmung nach der LRC-Technik mit ein [3, 4].

3.2. *Quantitative Lipoproteinelektrophorese (β -Lipoproteinmessung) im Vergleich mit der LRC-Methode und den geprüften LDL-Präzipitationsverfahren*

Die mit der quantitativen Lipoproteinelektrophorese erzielten Ergebnisse zeigen eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit dem Referenzverfahren, insbesondere auch bzgl. des LDL-Cholesterin [10, 29] (Tabelle 2). Erwartungsgemäß ergeben sich daher auch gute Übereinstimmungen zwischen dem elektrophoretisch ermittelten β -Cholesterin und dem nach Dextransulfatfällung bzw. Präzipitation mit Heparin bei saurem pH ermittelten LDL-Cholesterin [4, 10] (Tabelle 2). Ein Vergleich mit der Polyvinylsulfattechnik wurde in dieser Studie nicht durchgeführt. Ein uns bedeutend erscheinender Vorteil der quantitativen Lipoproteinelektrophorese gegenüber den Präzipitationstechniken besteht darin, daß das Elektropherogramm eine visuelle Plausibilitätskontrolle ermöglicht, die die Gefahr falscher Analysenergebnisse auf ein Minimum reduziert [10]. So kann es beispielsweise bei zu lange oder nicht kühl gelagerten Serumproben durch „Überalterung“ zu einer Veränderung der Struktur und Zusammensetzung der Lipoproteine kommen, wodurch sich auch ihre physikochemischen Eigenschaften ändern, auf denen alle Trenntechniken basieren. Überalterte Serumproben führen zwangsläufig auch bei elektrophoretischen Verfahren zu falschen Analysenergebnissen, sie sind aber anhand charakteristischer Veränderungen im Pherogramm leicht zu erkennen und von der Analytik auszuschließen. Demgegenüber liefern überalterte Serumproben bei den Fällungstechniken unbemerkt verfälschte Analysenergebnisse. Ein weiterer Störeinfluß bei der LDL-Cholesterinmessung kann sich aus dem Vorhandensein irregulärer Lipoproteine ergeben, bei denen zusätzlich oder anstelle der normalen Lipoproteinfraktionen intermediäre Lipoproteine (IDL, β -VLDL) oder abnorme Lipoproteine (z.B. LP-X) im Serum vorliegen. In solchen Fällen ist meist eine korrekte LDL-Quantifizierung weder mit elektrophoretischen noch mit Präzipitationsverfahren oder der Ultrazentrifuge möglich [10]. Auch hierbei erlaubt die Lipoproteinelektrophorese anhand bestimmter Merkmale im Pherogramm das Vorliegen irregulärer Lipoproteine zu erkennen, mit der Möglichkeit, eine solche Serumprobe einer weiterführenden Spezialanalytik zuzuführen. Dagegen liefern die Präzipitationstechniken auch in solchen Fällen unbemerkt falsche Analysenergebnisse [10]. Das vereinzelt zu beobachtende Vorliegen hoher LP(a)-Cholesterin-

konzentrationen beeinflußt die Spezifität der β -Cholesterinbestimmung durch die quantitative Lipoproteinelektrophorese im Unterschied zu den Fällungstechniken nicht.

Das Vorhandensein von Chylomikronen, z.B. bei nicht vollständig nüchternen Probanden, beeinträchtigt weder die Richtigkeit der β -Cholesterinmessung mittels der quantitativen Lipoproteinelektrophorese, noch übt es relevante Störeinflüsse auf die Präzipitationstechniken aus [10].

4. Zusammenfassende Diskussion

Die besonders in den 70iger und 80iger Jahren entwickelten Kenntnisse über den Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel ließen annehmen, daß eine differenzierte Lipoproteinanalytik im Serum bei der Bewertung der Fettstoffwechselsituation eines Patienten und des hiervon ausgehenden individuellen Atheroskleroserisikos spezifischer und sensitiver, also aussagekräftiger sein müßte als eine reine Lipid- (Cholesterin-, Triglycerid-) Messung. Mehrere epidemiologische Studien haben diese Annahme zwischenzeitlich eindeutig bestätigt. Dabei wurde die überragende Bedeutung des Serum-LDL-Spiegels für die Determinierung des Atherosklerose- und insbesondere des Koronarskleroserisikos deutlich [8, 12, 17, 19, 25]. Dieses ging nicht zuletzt auch aus einer großen primären Interventionsstudie hervor, in der gezeigt wurde, daß eine ca. 10%ige Minderung des LDL-Spiegels mit einer ca. 20%igen Senkung des Risikos für Folgeerscheinungen der Koronarsklerose einhergeht [19]. Ein vergleichbares Ergebnis gibt es weder für eine Lipidkomponente des Serums (Cholesterin, Triglyceride, Phospholipide) noch für ein Apoprotein oder für eine andere Lipoproteinfraktion, einschl. der in der Vergangenheit sicherlich klinisch überschätzten HDL. Als praktische Konsequenz ergibt sich aus diesen Befunden die Aufforderung, eine zeitgemäße Fettstoffwechseldiagnostik so anzulegen, daß sie dem behandelnden Arzt eine verlässliche Information über das individuelle Lipoproteinmuster, zumindest aber über die LDL-Cholesterinkonzentration im Serum seines Patienten gibt. Hierzu ist nicht immer eine direkte Lipoproteinquantifizierung erforderlich. In vielen Fällen kann auch schon die Lipidmessung (Cholesterin- und Triglyceridmessung) eine recht verlässliche Auskunft über eine wahrscheinlich normale oder erhöhte LDL-Cholesterinkonzentration geben. Besonders aus Kostengründen bleibt das Lipidscreening der erste Schritt in der Fettstoffwechseldiagnostik. Dessen Ergebnis ist, in Anlehnung an eigene Befunde sowie Empfehlungen amerikanischer Gesundheitsorganisationen und -behörden [11, 21, 22, 24, 25], wie folgt zu bewerten:

– Cholesterin unter 200 mg/dl, Triglyceride unter 250 mg/dl: Es besteht mit hoher Wahrschein-

lichkeit eine normale Fettstoffwechselsituation, insbesondere kann von einem normalen LDL-Cholesterinspiegel ausgegangen werden. Eine Therapie ist nicht erforderlich, ebensowenig eine weiterführende Diagnostik.

– Cholesterin über 280 mg/dl, Triglyceride unter 250 mg/dl: Es besteht mit hoher Wahrscheinlichkeit ein erhöhter LDL-Cholesterinspiegel und dementsprechend ein überdurchschnittliches Atheroskleroserisiko. Eine Behandlung zur Senkung des LDL-Cholesterinspiegels in solchen Fällen ist angezeigt, eine weiterführende Diagnostik ist nicht erforderlich.

– Cholesterin zwischen 200 und 280 mg/dl und/oder Triglyceridkonzentration >250 mg/dl: Aus einer solchen Lipidkonstellation ist kein verlässlicher Rückschluß auf das Lipoproteinmuster und insbesondere auf den LDL-Cholesterinspiegel oder das Atheroskleroserisiko möglich. Eine weiterführende Lipoproteinanalytik, zumindest eine direkte Bestimmung des LDL-Cholesterinspiegels ist daher indiziert. Normkriterien zur Bewertung des Ergebnisses einer differenzierten Lipoproteinanalytik sind ausführlich in Abschnitt 1 dargestellt [11, 12, 26].

Ist nach dem Ergebnis des Lipidscreening eine weiterführende Lipoproteinanalytik erforderlich, so kommen hierfür im Rahmen von Routineuntersuchungen entweder die quantitative Lipoproteinelektrophorese (Trennung der Lipoproteine in Agarose; Darstellung der Lipoproteinfraktionen durch Polyanionenfällung) oder verschiedene Fällungstechniken zur LDL-Cholesterinbestimmung infrage. Nicht geeignet und auch nicht wesentlich einfacher erscheint uns die Berechnung des LDL-Cholesterin über die Friedewaldformel (Einzelheiten hierzu s. Abschnitt 2.4.). Gleiches gilt für die Bestimmung des Apoprotein B, der Haupteiweißkomponente der LDL-Partikel zur Abschätzung des LDL-Cholesterins. Das letztgenannte Verfahren mag für einige wissenschaftliche Fragen durchaus interessant sein, in der Routinediagnostik ist es aber u.E. aus verschiedenen Gründen [10, 25] weniger aussagefähig als eine methodisch einwandfreie LDL-Cholesterinmessung. Bei vergleichender Bewertung der Präzipitationstechniken zur LDL-Cholesterinmessung und der β -Cholesterinbestimmung mittels quantitativer Lipoproteinelektrophorese ergeben sich für das letztgenannte Verfahren Vorteile bzgl. Richtigkeit, Präzision und Informationsgehalt (z.B. Erkennen irregulärer Lipoproteinmuster). Die in der Mehrheit ebenfalls präzise und korrekt arbeitenden Fällungstechniken zeichnen sich dagegen durch einen besonders geringen methodischen Aufwand mit der Möglichkeit zu einer teilweisen Mechanisierung aus.

Der bedeutendste Störfaktor für alle genannten Techniken zur LDL-Cholesterinbestimmung ist die

unsachgemäße Behandlung der Proben im präanalytischen Stadium, d.h. im wesentlichen eine zu lange oder zu warme Lagerung. Dabei führen lipolytische Vorgänge zu einer Veränderung der Struktur und Zusammensetzung der Lipoproteine und zu einem vermehrten Auftreten freier Fettsäuren. Eine solche „Überalterung“ von Serumproben geht einher mit einem veränderten physikochemischen Verhalten der Lipoproteine. Dieses wiederum führt in der quantitativen Lipoproteinelektrophorese zu nicht auswertbaren Pherogrammen, die jedoch immerhin als zur Analyse ungeeignet erkannt und aussortiert werden können [10]. Mit den Fällungstechniken werden dagegen an „überalterten“ Serumproben unbemerkt falsch niedrige (Dextransulfat- bzw. PVS-Fällung) oder falsch hohe (Fällung mit Heparin im sauren Milieu bzw. polyzyklischen Anionen) Meßergebnisse für LDL-Cholesterin gefunden.

Gegenüber überhöhten Triglyceridkonzentrationen, die bekanntlich generell Probleme bei klinisch-chemischen Analysen aufwerfen können, erweisen sich die in dieser Arbeit genannten Techniken zur LDL-Cholesterinquantifizierung (mit Ausnahme der Friedewald-Formel) im Prinzip als wenig anfällig. Wird die Analyse an sehr frischen Serumproben durchgeführt, sind korrekte Ergebnisse, zumindest mit jenen Verfahren, über die uns die umfassendsten Erfahrungen vorliegen (quantitative Lipoproteinelektrophorese, Dextransulfatfällung, Heparinfällung im sauren Milieu), ohne weiteres auch noch bei Triglyceridkonzentrationen um 500 mg/dl und darüber zu erzielen. Dies gilt auch, wenn die erhöhten Triglyceridspiegel durch Vorliegen von Chylomikronen bedingt sind, z.B. bei der Untersuchung postprandial entnommener Serumproben. Alle genannten Präzipitationstechniken wie auch die quantitative Lipoproteinelektrophorese werden im Gegensatz zur Friedewaldformel durch Chylomikronen nicht oder nur geringfügig beeinflusst. Allerdings ist bei der Untersuchung triglyceridreicher Proben grundsätzlich zu bedenken, daß lipolytische Prozesse hier stärker als bei triglyceridarmen Seren ablaufen, so daß sich methodische Störungen durch „Überalterung“ der Proben entsprechend früher einstellen können. Allerdings finden sich diesbezüglich erhebliche Unterschiede von Probe zu Probe, so daß keine allgemeinen Regeln aufgestellt werden können, bei welchen Triglyceridkonzentrationen wie rasch mit Störeinflüssen zu rechnen ist. Zur Vermeidung einer vorzeitigen „Überalterung“ von Probenmaterial ist es wichtig, Blut spätestens 1–2 Stunden nach der Entnahme bei 4° C und 3000–5000 RPM zu zentrifugieren und so Serum zu gewinnen. Dieses ist dann stets bei 4° C bis zur Analyse zu lagern. Seren, die länger als 1 Tag bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, liefern im allgemeinen keine korrekten Lipoproteindaten mehr. Eine ausrei-

chende Stabilität im Kühlschrank ist dagegen in aller Regel über mindestens 3 Tage gewährleistet.

Zusammenfassend erscheint uns die Einbeziehung geeigneter Lipoproteinanalysen, insbesondere einer direkten Messung des LDL- bzw. β -Cholesterins, in die routinemäßige Fettstoffwechseldiagnostik heute möglich und in all jenen Fällen notwendig, in denen ein Lipidscreening keine eindeutige Aussage liefert.

Literatur

1. American Heart Association (1986) Heart Facts. Am Heart Assoc, Dallas, USA, 1985
2. Antti A, Soimakallio S, Voutilainen E, Ehnholm Ch, Wiljasalo M (1986) Serumlipoprotein lipid and apoprotein levels as indicators of the severity of angiographically assessed coronary heart disease. *Atherosclerosis* 62:219–225
3. Armstrong VW, Walli AK, Seidel D (1985) Isolation and characterisation of an apo(a) free lipoprotein obtained on reduction of lipoprotein(a). *J Lipid Res* 26:1315–1321
4. Armstrong VW, Seidel D (1985) Evaluation of a commercial kit for the determination of LDL cholesterol in serum based on precipitation of LDL with dextran sulfate. *Arztl Lab* 31:325–330
5. Armstrong VW, Cremer P, Eberle E, Manke A, Schulze F, Wieland H, Kreuzer H, Seidel D (1986) The association between serum Lp(a) concentrations and angiographically assessed coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 62:249–257
6. Assmann G, Jabs HU, Kohnert U, Nolte W, Schriewer H (1984) LDL-cholesterol determination in blood serum following precipitation of LDL with polyvinylsulfate. *Clin Chim Acta* 140:77–83
7. Breier Ch, Lisch HJ, Drexel H, Braunsteiner H (1986) Stellenwert der Lipoproteinelektrophorese für die quantitative Bewertung von Plasmalipoproteinen, *Dtsch Med Wochenschr* 11:1888–1890
8. Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34–47
9. Brown MS, Goldstein JL (1983) Lipoprotein metabolism in the macrophage. *Ann Rev Biochem* 52:223–261
10. Cremer P, Seidel D, Wieland H (1985) Quantitative Lipoproteinelektrophorese: Ihre routinemäßige Anwendung im Vergleich mit anderen Verfahren zur differenzierten Untersuchung des Fettstoffwechsels. *Lab Med* 9:39–51
11. Cremer P, Weise M, Wieland H, Seidel D, Schulze F, Kreuzer H (1982) Bewertung des Lipoproteinstatus von 657 koronarangiographierten Patienten mit und ohne Koronarsklerose. *Inn Med* 9:25–265
12. Cremer P, Kreuzer H, Seidel D (1986) Lipoproteine als Risikoindikatoren der koronaren Herzkrankheit bei Frauen. *Med Klin* 81:693–701
13. Dahlen GH, Guyton JR, Attar M, Farmer JA, Kautz J, Gotto AM (1986) Association of levels of lipoprotein Lp(a), plasma lipids and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography. *Circulation* 74:758–765
14. Fredrickson DS, Levy RI, Lees S (1967) Fat transport in lipoproteins: An integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med* 276:33–44, 94–103, 145–156, 215–225, 273–281
15. Friedewald WF, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of LDL-cholesterol concentration without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 8:499–502
16. Goldstein JL, Kita T, Brown MS (1983) Defective lipoprotein receptors in atherosclerosis. *N Engl J Med* 309:288–296
17. Kannel WB, Schatzkin A (1984) Risk factor analysis. *Prog Cardiovasc Dis* 26:309–332
18. Lipid Research Clinics Program (1974) Manual of laboratory operations, Vol 1: lipid and lipoprotein analysis. DHEW Publ. No. (NIH) 75–628. US Government Printing Office, Washington, USA
19. Lipid Research Clinics Program (1984) The lipid research clinics coronary primary intervention Trial results. *JAMA* 251:351–374
20. Mulder K, van Leuwen C, Schouten JA, van Gent CM, Snel MT, Lahey J, van der Voort HA (1984) An evaluation of three commercial methods for the determination of LDL-cholesterol. *Clin Chim Acta* 143:29–35
21. National Institute of Health, USA (1984) Treatment of hypertriglyceridemia. *JAMA* 251:1196–1200
22. NIH Consensus Development Panel (1985) Lowering blood cholesterol to prevent heart disease. *Arteriosclerosis* 5:404–412
23. Pooling Project Research Group (1978) Relationship of blood pressure, serum cholesterol, smoking habits, relative weight and ECG abnormalities to incidence of major coronary events: final report of the pooling project. *J Chron Dis* 31:201–306
24. Rifkind BM, Segal P (1983) Lipid research clinics program reference values for hyperlipidemia and hypolipidemia. *JAMA* 250:1869–1872
25. Seidel D, Cremer P, Thiery J (1985) Plasma Lipoproteine und Atherosklerose. *Internistische Welt* 8:114–124, 159–165
26. Seidel D, Cremer P (1987) Guidelines for the clinical evaluation of lipoprotein profiles: a first report from the Göttinger Risk-, Incidence- and Prevalence Study. In: Gotto AM (ed) *Atherosclerosis reviews*. Raven Press, New York, USA (in press)
27. Statistisches Bundesamt (1978) Ausgewählte Zahlen für das Gesundheitswesen. In: *Fachserie 12 (Gesundheitswesen), Reihe 4 (Todesursachen)*. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, S 35–46
28. Steinberg D (1983) Lipoproteins and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 3:283–301
29. Wieland H, Seidel D (1983) Quantitative lipoprotein electrophoresis. In: Lewis LA (ed) *CRC Handbook of electrophoresis*, vol. III. CRC Press, Boca Raton, USA, pp 83–102
30. Wieland H, Seidel D (1983) A simple and specific technique for precipitation of low density lipoproteins. *J Lipid Res* 24:904–909
31. Wilson PWF, Zech LA, Gregg RE, Schaefer EJ, Hoeg JM, Sprecher DL, Brewer HB (1985) Estimation of VLDL-cholesterol in hyperlipidemia. *Clin Chim Acta* 151:285–291
32. Windaus A (1910) Über den Gehalt normaler und atheromatöser Aorten an Cholesterin und Cholesterinestern. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 67:174–176

Prof. Dr. D. Seidel
Georg-August-Universität Göttingen
Zentrum Innere Medizin
Abteilung Klinische Chemie
Robert-Koch-Straße 40
D-3400 Göttingen