

Die Differentialdiagnostik von Fettstoffwechselstörungen unter besonderer Berücksichtigung methodischer Aspekte

Differential Diagnostics of Disorders in Lipid Metabolism with Special Consideration of Methodical Aspects

M. Nauck^{1,2} und H. Wieland¹

Zusammenfassung: In Konsensuskonferenzen wurden diagnostische Kriterien für die Bewertung von Fettstoffwechselstörungen formuliert und Richtlinien verabschiedet, wann und wie betroffene Patienten gegebenenfalls therapiert werden sollen. Neben der Bestimmung des Gesamtcholesterins und der Gesamt-Triglyzeride besitzt die exakte Quantifizierung der Cholesterinkonzentration der low density lipoproteins (LDL) und der high density lipoproteins (HDL) eine herausragende Bedeutung. Die von dem Center for Disease Control and Prevention (CDC) verwendeten Referenzmethoden werden beschrieben. Die analytische Qualität der einzelnen Methoden wird anhand des Gesamtfehlers beurteilt, der sich aus der Unrichtigkeit (Abweichung in %) und der Impräzision (ausgedrückt als Variationskoeffizient (%) * 1,96) errechnet. Der Gesamtfehler sollte für Gesamtcholesterin < 9% und für die Gesamt-Triglyzeride < 15% betragen. Für das LDL-Cholesterin wurde ein zulässiger Gesamtfehler von maximal 12% festgelegt und für das HDL-Cholesterin ein Grenzwert von 13%. Neben der rein analytischen Qualität muß die biologische Variabilität bei der Beurteilung der Daten berücksichtigt werden. Daraus ergibt sich, daß in der Regel zwei unabhängige Blutabnahmen in einem Zeitraum von ca. 2 Wochen durchgeführt werden sollten, bevor eine medizinische Beurteilung erfolgt. Unter den Apolipoproteinen konnte lediglich die Lp(a)-Bestimmung Eingang in die Routinediagnostik finden, obwohl hier zur Zeit immer noch gewaltige Unterschiede zwischen den einzelnen Testverfahren bestehen, da die Standardisierung noch nicht abgeschlossen ist.

Schlüsselwörter: Cholesterin; Triglyzeride; LDL-Cholesterin; HDL-Cholesterin; Referenzmethode; Center for Disease Control and Prevention (CDC).

Summary: Recommendations from consensus conferences were published, regarding how hyperlipidemia should be diagnosed and, if necessary, how patients should be treated. Beyond the determination of total cholesterol and total triglycerides, the exact quantification of low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) is mandatory. The reference methods, used by the Center for Disease Control and Prevention (CDC) are described. Total error is used for the assessment of analytical quality of each method, which is calculated by bias (in %) plus imprecision (expressed as coefficient of variation (CV) * 1.96). The total error for total cholesterol and total triglycerides should be < 9%, and < 15%, respectively. For LDL-C and HDL-C these cut-off points are < 12% and < 13%, which should not be exceeded. In addition to the pure analytical quality, the biological variability has to be taken into consideration. Therefore, normally two independent samples have to be taken within a time period of 2 weeks, before medical judgement should be made. In contrast to apolipoprotein A-I and apolipoprotein B, only the determination of Lp(a) could be included in the routine diagnosis, despite the fact that immense deviations are still observed between different methods, mainly due to the yet not completed standardisation for Lp(a).

Keywords: Cholesterol; Triglycerides; LDL-Cholesterol; HDL-Cholesterol; Reference method; Center for Disease Control and Prevention (CDC).

Konsensuskonferenzen

In großen Prospektivstudien wie der Framingham Heart- und der MRFIT-Studie wurde eindeutig gezeigt, daß mit erhöhten Serumcholesterinspiegeln die KHK-Mortalität ansteigt [1, 2]. Durch eine Senkung des LDL-Cholesterins um ca. 30% wurde in unterschiedlichen Interventionsstudien die Gesamt-Mortalitätsrate um ca. 20% und die Anzahl der Herzinfarkte um ca. 40% gesenkt [3-5]. Die Erkenntnisse über die Bedeutung der Lipid- bzw. Lipoproteinkonzentrationen wurden in Leitlinien für die Diagnostik und Behandlung von Fettstoffwechselstörungen zusammengestellt.

¹Universitätsklinikum Freiburg, Abteilung Klinische Chemie, Freiburg, Deutschland

²Korrespondenzadresse: PD Dr. Matthias Nauck, Universitätsklinikum Freiburg, Abteilung Klinische Chemie, Hugstetter Straße 55, 79106 Freiburg, Deutschland. Fax: +49-761-270-3444
E-mail: manauck@med1.ukl.uni-freiburg.de
Eingegangen: 3. Januar 2001/Angenommen: 4. Januar 2001

Dabei ergaben unabhängige Expertenkommissionen in Amerika [6] und Europa [7] ähnliche Ergebnisse.

Die Meßgrößen des Fettstoffwechsels werden unterschiedlich gewichtet, abhängig davon, ob bereits Vorerkrankungen im Sinne einer Arteriosklerose vorliegen (Sekundärprävention) oder nicht (Primärprävention). Anhand von mehreren Risikofaktoren wird versucht, das individuelle Risiko abzuschätzen, in Zukunft einen Myokardinfarkt zu erleiden.

Unabhängig vom LDL-Cholesterin werden die positiven Risikofaktoren Alter (bei Männern ≥ 45 Jahre, bei Frauen ≥ 55 Jahre), positive Familienanamnese, Rauchen, Bluthochdruck, niedriges HDL-Cholesterin (< 35 mg/dl) und Diabetes mellitus sowie der negative Risikofaktor hohes HDL-Cholesterin (≥ 60 mg/dl) berücksichtigt.

Von Seiten des Fettstoffwechsels ist das LDL-Cholesterin der entscheidende atherogene Risikofaktor. Konzentrationen über 190 mg/dl werden in jedem Fall als eigenständiger Risikofaktor interpretiert und sollten in den meisten Fällen auch medikamentös gesenkt werden. Beide Expertenkommissionen gehen einheitlich davon aus, daß das LDL-C unter 160 bzw. 155 mg/dl liegen sollte, wenn ein weiterer Risikofaktor vorhanden ist. Bei Vorliegen von zwei oder mehr Risikofaktoren für die KHK sollte das LDL-Cholesterin auf Werte unter 135 bzw. 130 mg/dl gesenkt werden. Bei Patienten in der Sekundärprävention sollten LDL-C Konzentrationen unter 100 mg/dl erreicht werden.

Die protektive Rolle der HDL wird insoweit berücksichtigt, als Konzentrationen über 60 bzw. 65 mg/dl das Vorhandensein eines anderen Risikofaktors ausgleichen.

Zur rationellen Erfassung einer Fettstoffwechselsituation sollten neben dem Gesamt-Cholesterin und dem HDL-C auch gleichzeitig die Gesamt-Triglyzeride nach einer 12stündigen Fastenperiode bestimmt werden, weil sich anhand dieser Meßgrößen das LDL-C nach Friedewald abschätzen läßt [8]. Inwieweit die neuen homogenen Verfahren zur direkten LDL-C Bestimmung dieses Vorgehen in Zukunft verändern, bleibt gegenwärtig abzuwarten [9, 10].

Referenzmethoden

In dem vergangenen Jahrzehnt konnten entscheidende Verbesserungen bei der Standardisierung und der analytischen Qualität der Lipid- und Lipoproteinbestimmungen erreicht werden.

In den Richtlinien der Bundesärztekammer aus dem Jahr 1988 ist verbindlich die Teilnahme an internen und externen Ringversuchen für klinisch-chemische Laboratorien geregelt [11]. Aus dem Bereich des Lipidstoffwechsels sind zur Zeit lediglich das Gesamt-Cholesterin und die Gesamt-Triglyzeride ringversuchspflichtige Meßgrößen, während z. B. für die Meßgrößen LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin keine Teilnahmepflicht besteht.

Ein Zertifikat für die Cholesterinbestimmung erhält man zur Zeit, wenn bei einem Referenzmethodenwert

von 225 (bzw. 99) mg/dl das eigene Ergebnis zwischen 184 (81,1) und 266 (117) mg/dl liegt. Dies sind „Vertrauensbereiche“, die Schwankungen vom Zielwert von $\pm 18,2\%$ erlauben und daher ihren Namen nicht verdienen.

Sinnvoller erscheinen unter diesem Aspekt die Bemühungen im Rahmen des National Cholesterol Education Program (NCEP) der USA, das zunächst im Jahr 1988 Empfehlungen für die Bestimmung des Cholesterins [12] und im Jahre 1995 Empfehlungen für die Bestimmung der Triglyzeride, des HDL-C und LDL-C publiziert hat [13-15].

Kernpunkt der Empfehlungen besteht in der Beurteilung der analytischen Qualität anhand des Gesamtfehlers, der sich aus der Impräzision (ausgedrückt als VK in%) und der Unrichtigkeit (ausgedrückt als Abweichung in%) nach folgender Formel errechnet. Gesamtfehler = Abweichung (%) + $1,96 \cdot$ VK (%).

Die Festlegung eines Gesamtfehlers hat den Vorteil, daß z. B. eine schlechte Präzision durch eine hohe Genauigkeit bei der Richtigkeit ausgeglichen werden kann oder umgekehrt. Anhand des Gesamtfehlers wird eine Meßmethode mit allen ihren Fehlermöglichkeiten beurteilt.

Ideal wäre es, jedem Labor einen Abgleich mit Referenzlaboratorien anhand von nicht eingefrorenen Patientenproben zu ermöglichen. Aufgrund der großen Anzahl von Laboratorien, die Cholesterinbestimmungen durchführen, ist dies aber nicht praktikabel. Kernpunkt der CDC (Center for Disease Control and Prevention) war es daher, direkt mit den Herstellern von Diagnostika-Produkten zu kooperieren und somit eine sehr gute Standardisierung zu erreichen [16]. Daher wurde im Jahr 1989 von der CDC begonnen, ein Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN) aufzubauen, dessen Ziel es ist, die CDC Referenzmethoden in mehreren Laboratorien zu etablieren. Zur Zeit sind elf Laboratorien weltweit an diesem Netzwerk beteiligt [16]. Damit besteht für die Hersteller von Diagnostika nun die Möglichkeit, ihre Produkte an den von der CDC verwendeten Referenzmethoden in einem dieser Laboratorien zu standardisieren [16].

Für die Überprüfung der Richtigkeit ist die Festlegung der Vergleichsmethode entscheidend. Den größten Stellenwert hat eine Überprüfung anhand der definitiven Methode, die in Form einer Isotopen Verdünnungsmethode aber lediglich für die Cholesterinbestimmung besteht [17]. Für die Triglyzeridbestimmung sind zwei Verfahren als definitive Methoden vom National Institute of Standards and Technology (NIST) publiziert und vorgeschlagen, die ebenfalls auf einer Isotopen Verdünnungsmethode beruhen [18].

Von der CDC wird die modifizierte Abell-Kendall Methode als Referenzmethode zur Überprüfung der Richtigkeit der Cholesterinbestimmung verwendet [12, 19-21]. Die Referenzmethode weist eine systematische positive Abweichung von 1,5% gegenüber der definitiven Methode auf, die zum Teil darauf beruht, daß Vorstufen der Cholesterinbiosynthese und Phytosterole mitgemessen werden [22, 23].

Vom National Committee for Clinical Laboratory Standards wird ein chemischer Triglyzeridnachweis vorübergehend als Referenzmethode anerkannt, der von der CDC verwendet wird [24-26].

Für die HDL-C Bestimmung besteht eine aufwendige Referenzmethode, die in drei Schritten durchgeführt wird: Zunächst werden die VLDL durch Ultrazentrifugation von dem übrigen Serum oder Plasma abgetrennt. Im verbleibenden Unterstand werden die ApoB-haltigen Lipoproteine (IDL, LDL und Lp(a)) durch Präzipitation mit Heparin/MnCl₂ gefällt. Der Cholesteringehalt der HDL wird mit der Referenzmethode nach Abell-Kendall im Überstand bestimmt.

Diese Methode wird als Referenzmethode angewendet, da sie die Grundlage für die Richtigkeit der HDL-C Bestimmungen in den großen US amerikanischen Populationsstudien gewesen ist, anhand derer die heute gültigen Grenzwerte für HDL-C abgeleitet wurden. Da diese Methode sehr aufwendig ist wurde in den letzten Jahren von der CDC eine vereinfachte Vergleichsmethode validiert, bei der die ApoB-haltigen Lipoproteine mit Dextransulfat präzipitiert werden und die anschließende Cholesterinbestimmung auch enzymatisch erfolgen kann. Nachteil dieser Methode besteht darin, daß ausschließlich Proben mit Gesamttriglyzeriden unter 200 mg/dl verwendet werden können [27].

Da es keine eigentliche Referenzmethode zur Bestimmung des LDL-C gibt, wird als Basis für die Richtigkeit die sogenannte ‚ β -Quantifizierung‘ nach den Kriterien der CDC angewendet. Sie besteht aus einer Kombination aus Ultrazentrifugation (18 h, 105.000 g) und anschließender Präzipitation mit Polyanionen (entsprechend Heparin/MnCl₂). Die durchgeführten Cholesterin- und HDL-Cholesterinbestimmungen müssen natürlich den bereits genannten Referenzmethoden entsprechen. Bei dieser Methode umfaßt das LDL-C das Cholesterin von VLDL-Remnants, IDL, Lp(a) und den eigentlichen LDL. In den Richtlinien wird darauf hingewiesen, daß in Zukunft herausgearbeitet werden soll, inwieweit der Cholesteringehalt der VLDL-Remnants, der IDL und des Lp(a) zum KHK-Risiko einer Person beitragen.

Methoden und Kriterien für die analytische Qualität

Cholesterin

Die Bestimmung des Gesamt-Cholesterins gehört zur Basisuntersuchung einer diagnostischen Abklärung einer Fettstoffwechselsituation. In den Routinelaboratorien erfolgt seit Jahren die Quantifizierung des Cholesterins enzymatisch, in dem zunächst durch eine Esterase die Fettsäure am C₃-Atom hydrolysiert und anschließend das freie Cholesterin oxidiert wird. Das dabei entstehende H₂O₂ kann durch die Trinder-Reaktion umgesetzt werden, wobei die Extinktionsänderung der umgesetzten Cholesterinmenge linear ist. War bei den ersten Reagenzien die enzymatische Hydrolyse

kritisch, lösen die heute verwendeten Enzyme mehr als 99% der Esterverbindungen [28].

Gemäß den Richtlinien der NCEP gelten ab dem Jahr 1992 eine Abweichung in der Richtigkeit von $\pm 3\%$, ebenso für die Impräzision von $\pm 3\%$. Damit ergibt sich ein zulässiger Gesamtfehler von $\leq 9\%$ [12].

Triglyzeride

Den Bestimmungen der Triglyzeride wird in beiden Kommissionen nur ein untergeordneter Stellenwert zugeschrieben. Konzentrationen über 200 mg/dl sollten überprüft werden, ob sie mit einer Dyslipidämie einhergeht, wie sie z. B. bei familiärer kombinierter Hyperlipidämie oder bei Vorliegen eines Diabetes mellitus beobachtet werden, da sie mit einem erhöhten KHK-Risiko vergesellschaftet sind. Konzentrationen über 400 mg/dl sind pathologisch erhöht. Bei Triglyzeridkonzentrationen über 1000 mg/dl muß die Gefahr einer akuten Pankreatitis beachtet werden. Die Triglyzeridbestimmung wird zur Abschätzung des LDL-C nach Friedewald benötigt [8].

Die Richtigkeit darf eine Abweichung von $\pm 5\%$ aufweisen, ebenso wie die Impräzision, so daß sich insgesamt ein Gesamtfehler von $\leq 15\%$ ergibt [13].

HDL-Cholesterin

Bis vor wenigen Jahren erfolgte die Bestimmung des HDL-Cholesterins entweder nach Präzipitation der ApoB-haltigen Lipoproteine oder mittels der Lipoproteinelektrophorese. Durch die Neuentwicklung der homogenen Verfahren zur HDL-C Bestimmung konnte die analytische Qualität gerade in Hinblick auf die Präzision erheblich verbessert werden, so daß die NCEP-Kriterien sicher eingehalten werden können [29].

Die Empfehlungen für die HDL-C-Bestimmung legen fest, daß der Variationskoeffizient bei HDL-C-Konzentrationen über 42 mg/dl nicht mehr als 4% betragen darf und bei Werten unter 42 mg/dl die Standardabweichung unter 1,7 mg/dl liegen muß [14]. Zusätzlich darf die Richtigkeit um maximal $\pm 5\%$ von der Referenzmethode des Center for Disease Control (CDC) abweichen. Der Gesamtfehler soll dabei den Wert von 13% nicht überschreiten [14].

LDL-Cholesterin

In den meisten Fällen wird das LDL-C nach der Formel nach Friedewald abgeschätzt [8]. Zur Berechnung des LDL-Cholesterins werden benötigt: Gesamt-Cholesterin, Gesamt-Triglyzeride und das HDL-Cholesterin. Das LDL-Cholesterin berechnet sich entsprechend der Formel:

Serumcholesterin - HDL-Cholesterin - (Serumtriglyzeride/5), wenn die Angaben in mg/dl erfolgen. Die Bestimmung der Serumtriglyzeride ermöglicht eine Abschätzung der VLDL-C Konzentration. Dies ist möglich, da die Triglyzeride im Serum in erster Linie in den VLDL angesiedelt sind. Allerdings unterliegt die Friedewald-Formel einigen Einschränkungen, die häufig nicht beachtet werden:

1. Die Blutabnahme darf nur nach 12stündiger Nahrungskarenz erfolgen, da sich sonst triglyzeridreiche Chylomikronen im Blut befinden können. Der Triglyzeridgehalt der Chylomikronen wird fälschlicherweise den VLDL zugerechnet, so daß das VLDL-Cholesterin überschätzt und demzufolge das LDL-Cholesterin unterschätzt wird.
2. Das LDL-Cholesterin sollte nur berechnet werden, wenn die Serumtriglyzeride unterhalb von 400 mg/dl liegen. Diese Einschränkung ist sinnvoll, da sich bei Hypertriglyzeridämikern die Triglyzeride auch in den LDL und HDL anreichern können und die Zusammensetzung der VLDL großen Schwankungen unterliegt.
3. Die dritte Einschränkung besteht in den seltenen Fällen, in denen eine Typ III-Hyperlipoproteinämie nach Fredrickson vorliegt. Dabei wird das LDL-Cholesterin weit überschätzt ohne zu erkennen, daß die Lipoproteine atypisch zusammengesetzt sind, wodurch das KHK-Risiko stark erhöht wird.

Diese Methode wird als Routine-Methode empfohlen [30]. Allerdings wurden diese Empfehlungen noch nicht überarbeitet, nachdem die homogenen LDL-Cholesterinassays entwickelt wurden, die zumindest bei der Präzision erheblich besser abschneiden als es von der Formel nach Friedewald erreicht werden kann [9, 19].

Die Bedeutung der Präzipitationsverfahren zur LDL-C Bestimmung hat in der letzten Zeit stark abgenommen. Sie sind im Vergleich zu den homogenen Verfahren relativ aufwendig durchzuführen und es ist zum Teil zweifelhaft, ob wirklich LDL präzipitiert werden [31-33].

Die Empfehlungen für die Bestimmung des LDL-Cholesterins entsprechen einer Impräzision von $\leq 4\%$ und einem Bias von $\leq 4\%$, womit der Gesamtfehler weniger als 12% beträgt [15].

Die modernen klinisch-chemischen Analysegeräte zeigen eine hohe Präzision, so daß z. B. für eine Cholesterinbestimmung ein VK von Tag zu Tag von 3% und weniger realistisch ist. Das bedeutet, daß bei einem Zielwert von 200 mg/dl der 95%-Streubereich von 188 bis 212 mg/dl reicht.

Die Bedeutung der Impräzision zeigt sich bei der Überwachung einer lipidsenkenden Therapie. Ein Therapieerfolg liegt vor, wenn der Unterschied aus zwei Blutabnahmen die kritische Differenz (D_K) überschreitet, die sich aus der SD von Tag zu Tag ($D_K \approx 2,8 \times SD$) berechnet. Bei einem Ausgangswert von 200 mg/dl heißt das, daß erst bei einem gemessenen Wert von weniger als 183 mg/dl von einer therapeutischen Cholesterinsenkung ausgegangen werden darf.

Biologische Variabilität

Neben der analytischen Streuung ist die biologische Variabilität für die Beurteilung der Meßergebnisse maßgebend. Die biologische Streuung wird als biologischer VK (VK_B) bezeichnet und liegen für Gesamt-

Cholesterin bei ca. 6%, für Triglyzeride bei ca. 25%, für LDL-C bei ca. 9% und für HDL-C bei ca. 7% [34, 35]. Um Patienten zuverlässig das individuelle KHK-Risiko zuordnen zu können, sollte die gesamte intra-individuelle Variation für die Gesamt-Cholesterinbestimmung $< 5\%$ betragen [36].

Um dieses strenge Ziel zu erreichen müssen bei einer biologischen Variabilität für das Gesamtcholesterin von 6% [37] und einem analytischen $VK_A = 3\%$ zwei unabhängige Blutabnahmen erfolgen, die mindestens 1 Woche, besser 2 Wochen, auseinander liegen sollten [36, 38].

Ist die analytische Qualität schlechter, müssen weitere Blutabnahmen erfolgen. Um die Schwankungen durch die biologische Variabilität einzugrenzen, ist es klinisch sinnvoller, den Mittelwert aus mehreren aufeinanderfolgenden Blutabnahmen zu bilden, als Mehrfachbestimmungen in einer Probe durchzuführen [39]. Einzelmessungen können zur zuverlässigen Beurteilung lediglich dann herangezogen werden, wenn die Meßwerte relativ weit weg von den Entscheidungskriterien liegen [40].

Apolipoproteine

Die Bestimmung der Apolipoproteine hat in der Routine-Diagnostik keinen großen Stellenwert erlangt, auch wenn in den letzten Jahren immer wieder Daten publiziert wurden, die gerade dem Quotienten aus Apo B zu Apo A-I einen diagnostischen Stellenwert beimessen [41].

Dies liegt daran, daß in den großen klinischen Prospektiv- bzw. Interventionsstudien die Apolipoproteine nur selten bestimmt wurden und damit keine Grenzwerte definiert werden konnten. In einigen Prospektivstudien wurde die klinische Wertigkeit der Apolipoproteine den Bestimmungen von LDL-C und HDL-C als Risikomarker für die KHK gegenübergestellt. Dabei resultierte durch die Apolipoproteinbestimmung kein zusätzlicher Informationsgewinn [42-48].

Analytisch können die Apolipoproteine unterdessen zuverlässig bestimmt werden und durch die Standardisierung der IFCC findet sich auch eine gute Übereinstimmung zwischen unterschiedlichen Laboratorien [49, 50]. Inzwischen wurden in der Framingham Offspring Study mit diesen standardisierten Verfahren die Verteilungen der Apolipoproteine A-I und B bestimmt [51, 52].

Das Lipoprotein(a), Lp(a), nimmt eine Sonderstellung ein [53]. Lipoprotein(a) wurde zuerst von Berg im Jahr 1963 als eine genetische Variante des LDL beschrieben [54]. Später wurde erkannt, daß Lp(a) mit dem „sinking pre- β -Lipoprotein“ identisch ist, einem Partikel mit elektrophoretischer prä- β -Mobilität, der jedoch nicht zu den VLDL gehört [55, 56]. Vom strukturellen Aufbau her ist das Lp(a) ein LDL-Partikel, an den zusätzlich über eine Disulfidbrücke Apo(a) gebunden ist [57]. Es hat eine Dichte von 1,050 bis 1,120 kg/l und überlappt damit den Dichtebereich von LDL und HDL₂ [58]. Apolipoprotein(a) weist eine hohe

Strukturhomologie mit Plasminogen auf [59], wodurch der Schluß nahelegt, daß es bei der Fibrinolyse eine modulierende Rolle spielen könnte. Die Isoformen des Apo(a) schwanken zwischen 400 und 700 kDa [60]. Der Apo(a)-Größenpolymorphismus ist eine Folge von Variationen der Anzahl der sogenannten kringel IV Elemente in der mRNA des Apo(a) [61]. Der Apo(a)-Phänotyp wird durch SDS-Page mit anschließendem Western-Blot, der genetische Polymorphismus durch Pulsed-field Gelelektrophorese exakt bestimmt [62].

Aus vielen Studien folgt, daß Lp(a) ein starker, unabhängiger Risikofaktor für die KHK ist [63-70]. Dabei ist Lp(a) besonders atherogen, wenn es in Kombination mit hohen LDL-Cholesterinkonzentrationen auftritt [65]. Auch wenn die Ergebnisse der Prospektivstudien nicht durchweg positiv sind, hat eine Meta-Analyse der Prospektivstudien ergeben, daß Lp(a) bei Männern und Frauen als Risikofaktor für die KHK anzusehen ist [71].

In den letzten Jahren wurden Anstrengungen unternommen, die Standardisierung der Lp(a)-Bestimmung zu ermöglichen [71, 72]. Aufgrund des ausgeprägten Polymorphismus und der unterschiedlichen Detektionsverfahren (RIA, DELFIA, ELISA, Nephelometrie, Turbidimetrie, Cholesterinbestimmung) ist die Lp(a)-Bestimmung starken methodischen Schwankungen unterworfen. Allein zwischen unterschiedlichen immunoturbidimetrischen oder ELISA Verfahren schwanken die Unterschiede um den Faktor 3 [71]. Von daher ist es verwunderlich in wie vielen Publikationen ein Grenzwert für die Lp(a)-Masse von 30 mg/dl angenommen wird, ab dem das KHK-Risiko deutlich ansteigt.

Die meisten kommerziellen Lp(a)-Kits verwenden Antikörper, die gegen das repetitive Epitop des Apo(a) gerichtet sind. Allerdings ermöglichen nur die Antikörper, die gegen ein einzelnes Epitop im Apo(a) oder mit dem Detektionsantikörper gegen Apo-B gerichtet sind, eine Lp(a)-Quantifizierung, die - zumindest theoretisch - unabhängig vom Apo(a)-Polymorphismus ist. Durch die Angabe der Masse des Lp(a)-Partikels in mg/dl werden bereits Fehler verursacht, weil das Verhältnis zwischen ApoB und Apo(a) von der Isoform abhängig ist. Daher ist es sinnvoller, die Lp(a)-Konzentration in nmol/l anzugeben, so daß die Anzahl der Partikel bestimmt wird.

Ziel ist es nun einen Sekundärstandard zu etablieren, dessen Konzentration in nmol/l angegeben wird und der in seiner Zusammensetzung in erster Linie Lp(a)-Isoformen mit 20 - 24 kringel IV Wiederholungen enthält. Es konnte gezeigt werden, daß durch die Verwendung eines einheitlichen Standards die Übereinstimmung zwischen den unterschiedlichsten Nachweissystemen erheblich verbessert wird [71, 72]. In der nächsten Phase muß der Sekundärstandard auf die Standards der einzelnen Hersteller übertragen werden, so daß die einzelnen Laboratorien davon profitieren. Mit diesen standardisierten Meßverfahren wird es dann leichter möglich sein, die Bedeutung des Lp(a) in der Atherogenese zu untersuchen.

Literatur

1. Castelli WP. Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease - the Framingham Heart Study. *Can J Cardiol* 1988;4:5A-10A.
2. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screens of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986;256:2823-8.
3. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-9.
4. Sacks FM, Pfeffer MA, Moya LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996;335:1001-9.
5. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301-7.
6. Grundy SM. National Cholesterol Education Program: Second Report of the Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *Circulation* 1994;89:1329-445.
7. Prevention of coronary heart disease: scientific background and new clinical guidelines. Recommendations of the European Atherosclerosis Society prepared by the International Task Force for Prevention of coronary heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1992;2:113-56.
8. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
9. Sugiuchi H, Irie T, Uji Y, Ueno T, Chaen T, Uekama K, Okabe H. Homogeneous assay for measuring low-density lipoprotein cholesterol in serum with triblock copolymer and alpha-cyclodextrin sulfate. *Clin Chem* 1998;44:522-31.
10. Nauck M, Graziani M, Briton D, Cobbaert C, Cole T, Lefevre F, Riesen W, Bachorik P, Rifai, N. Analytical and clinical performance of a detergent-based homogeneous LDL cholesterol assay: a multicenter evaluation. *Clin Chem* 2000;46:506-14.
11. Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien. *Dtsch Arztebl* 1988;85:A697-A712.
12. Current status of blood cholesterol measurement in clinical laboratories in the United States: A report from the laboratory standardization panel of the National Cholesterol Education Program. *Clin Chem* 1988;34:193-201.
13. Stein E, Myers G. National Cholesterol Education Program Recommendations for Triglyceride Measurement: Executive Summary. *Clin Chem* 1995;41:1421-6.
14. Warnick GR, Wood PD. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: executive summary. The National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement. *Clin Chem* 1995;41:1427-33.
15. Bachorik PS, Ross JW. National Cholesterol Education Program recommendations for measurements of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary. National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurements. *Clin Chem* 1995;44:1414-20.
16. Myers G, Kimberly M, Waymack P, Smith S, Cooper G, Sampson E. A reference method laboratory network for cholesterol: A model for standardization and improvement of clinical laboratory measurements. *Clin Chem* 2000;46:1762-72.
17. Cohen A, Hertz H, Mandel J, Paule RC, Schaffer R, Sniegoski LT, Sun T, Welch MJ, White E. Total serum cholesterol by isotope dilution/mass spectrometry: a candidate definitive method. *Clin Chem* 1980;26:854-60.
18. Ellerbe P, Sniegoski L, Zak B. Isotope dilution mass spectrometry as a candidate definitive method for determining total glycerides and triglycerides in serum. *Clin Chem* 1995;41:397-404.
19. Abell L, Levy B, Brodie R, Kendall F. Simplified method for the estimation of total cholesterol in serum, and demonstration of its specificity. *J Biol Chem* 1951;195:357-66.

20. Liebermann C. Über das Oxychinoterpen. *Ber Dtsch Chem Ges* 1885;18:1803-9.
21. Burchard H. Zur Kenntnis des Cholesterins. *Chem Zentralbl* 1890;61:25-7.
22. Ellerbe P, Myers G, Cooper G, Hertz H, Sniegoski L, Welch M, White E. A comparison of results for cholesterol in human serum obtained by the Reference Method and by the Definitive Method of the National Reference System for cholesterol. *Clin Chem* 1990;36:370-5.
23. Bernert JJ, Akins J, Cooper G, Poulouse A, Myers G, Sampson E. Factors influencing the accuracy of the national reference system total cholesterol reference method. *Clin Chem* 1991;37:2053-61.
24. Carlson L, Wadström L. Determination of glycerides in blood serum. *Clin Chim Acta* 1959;4:197.
25. Van Handel E, Zilversmit D. *J Lab Clin Med* 1957;50:152-7.
26. Lofland HJ. *Anal Biochem* 1964;9:393-400.
27. Kimberly M, Leary E, Cole T, Waymack P. Selection, validation, standardization, and performance of a designated comparison method for HDL-cholesterol for use in the cholesterol reference method laboratory network. *Clin Chem* 1999;45:1803-12.
28. Bateson J, Artiss J, Zak B. Sensitive enzymatic methods for HDL and HDL subclass cholesterol measurement. *Clin Chem* 1988;34:1230.
29. Nauck M, Graziani M, Jarausch J, Bruton D, Cobbaert C, Cole TG, Colella F, Lefevre F, Gillery P, Haas B, Law T, König M, Macke M, März W, Meier C, Riesen W, van Vliet M, Wieland H, Rifai N. A new liquid homogeneous assay for HDL cholesterol determination evaluated in seven laboratories in Europe and the United States. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:1067-76.
30. Bachorik P, Ross J. Guidelines on the measurement of low density lipoprotein cholesterol: executive summary. The National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement. *Clin Chem* 1995;41:1414-20.
31. Mainard F, Madec Y. Are 'precipitated LDL' really low density lipoproteins? *Clin Chim Acta* 1987;162:141-6.
32. Siekmeier R, März W, Gross W. Precipitation of LDL with sulfated polyanions: three methods compared. *Clin Chim Acta* 1988;177:221-30.
33. Nauck M, Friedrich I, Wieland H. Measurement of LDL and VLDL cholesterol with precipitation techniques. A comparison with the ultracentrifugation method. *Clin Lab* 1994;40:167-76.
34. Smith S, Cooper G, Myers G, Sampson E. Biological variability in concentrations of serum lipids: sources of variation among results from published studies and composite predicted values. *Clin Chem* 1993;39:1012-22.
35. Marcovina S, Gaur V, Albers J. Biological and analytical variability (monthly) of lipids and apolipoproteins under stringent pre-analytical conditions. *Clin Chem* 1994;40:574-8.
36. Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). *JAMA* 1993;269:3015-23.
37. Cooper G, Smith S, Myers G, Sampson E, Magid E. Estimating and minimizing effects of biologic sources of variation by relative range when measuring the mean of serum lipids and lipoproteins. *Clin Chem* 1994;40:227-32.
38. Choudhury N, Wall P, Truswell A. Effect of time between measurements on within-subject variability for total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol in women. *Clin Chem* 1994;40:710-5.
39. Aufenanger J, Zawta B. Pre-analytical Aspects of Lipoprotein Measurement. *Clin. Lab.* 1999;45:535-46.
40. Bookstein L, Gidding S, Donovan M, Smith F. Day-to-day variability of serum cholesterol, triglyceride, and high-density-lipoprotein cholesterol levels: impact on the assessment of risk according to the National Cholesterol Education Program guidelines. *Arch Intern Med* 1990;150:1653-7.
41. Graziani M, Zanolla L, Righetti G, Marchetti C, Mocarelli P, Marcovina S. Plasma apolipoproteins A-I and B in survivors of myocardial infarction and in a control group. *Clin Chem* 1998;44:134-40.
42. Sigurdsson G, Baldursdottir A, Sigvalderson H, Agnarsson G, Thorgerirsson G, Siguffson N. Predictive value of apolipoproteins in a prospective survey of coronary artery disease in men. *Am J Cardiol* 1992;69:1251-4.
43. Ishikawa T, Fidge N, Thelle D, Forde D, Miller N. The Tromsø Heart Study: serum apolipoprotein A-I concentration in relation to future coronary heart disease. *Eur J Clin Invest* 1978;8:179-82.
44. Salonen J, Salonen R, Penttilä I, Herranen J, Jauhainen M, Kantola M, Lappetelainen R, Maenpää PH, Alftan G, Puska P. Serum fatty acids, apolipoproteins, selenium and vitamin antioxidants and the risk of death from coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1985;6:226-31.
45. Stampfer M, Sacks F, Salvini S, Willett W, Hennekens C. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1991;56:226-31.
46. Coleman M, Key T, Wang D, Hermon C, Fentiman IS, Allen DS, Jarvis M, Pike MC, Sanders TA. A prospective study of obesity, lipids, apolipoproteins, and ischemic heart disease: implications for screening. *Atherosclerosis* 1992;92:177-85.
47. Wald N, Law M, Watt H, Wu T, Bailey A, Johnson A, Craig WY, Ledue TB, Haddow JE. Apolipoproteins and ischemic heart disease: implications for screening. *Lancet* 1994;343:75-9.
48. Lamarche B, Espres J, Moorjani S, Cantin B, Dagenais G, Lupien P-J. Prevalence of dyslipidemic phenotypes in ischemic heart disease (prospective results from the Quebec Cardiovascular Study). *Am J Cardiol* 1995;75:1189-95.
49. Marcovina S, Albers J, Henderson L, Hannon W. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoprotein A-I and B. III. Comparability of apolipoprotein A-I values by use of international reference material. *Clin Chem* 1993;39:773-81.
50. Marcovina S, Albers J, Kennedy H, Mei J, Henderson L, Hannon W. International Federation of Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A-I and B. IV. Comparability of apolipoprotein B values by use of international reference material. *Clin Chem* 1994;39:773-81.
51. Contois J, McNamara J, Lammi-Keefe C, Wilson P, Massov T, Schaeffer E. Reference intervals for plasma apolipoprotein A-I determined with a standardized commercial immunoturbidimetric assay: results from the Framingham Offspring Study. *Clin Chem* 1996;42:507-14.
52. Contois J, McNamara J, Lammi-Keefe C, Wilson P, Massov T, Schaeffer E. Reference intervals for plasma apolipoprotein B determined with a standardized commercial immunoturbidimetric assay: results from the Framingham Offspring Study. *Clin Chem* 1996;42:515-23.
53. Utermann G. The mysteries of lipoprotein(a). *Science* 1989;246:904-10.
54. Berg K. A new serum type system in man - the Lp system. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1963;59:369-82.
55. Dahlen G, Ericson C, Furberg C, Lundkvist L, Svardsudd K. Studies on an extra pre-beta lipoprotein fraction. *Acta Med Scand Suppl* 1972;531:1-29.
56. Heiberg A, Berg K. On the relationship between Lp(a) lipoprotein, „sinking pre-beta-lipoprotein“ and inherited hyper-beta-lipoproteinemia. *Clin Genet* 1974;5:144-56.
57. Armstrong VW, Walli AK, Seidel D. Isolation, characterization, and uptake in human fibroblasts of an apo(a)-free lipoprotein obtained on reduction of lipoprotein(a). *J Lipid Res* 1985;26:1314-23.
58. Fless GM, Rolih CA, Scanu AM. Heterogeneity of human plasma lipoprotein (a). Isolation and characterization of the lipoprotein subspecies and their apoproteins. *J Biol Chem* 1984;259:11470-8.
59. McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987;330:132-7.
60. Utermann G, Menzel HJ, Kraft HG, Duba HC, Kemmler HG, Seitz C. Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin Invest* 1987;80:458-65.
61. Koschinsky ML, Beisiegel U, Henne-Bruns D, Eaton DL, Lawn RM. Apolipoprotein(a) size heterogeneity is related to variable number of repeat sequences in its mRNA. *Biochemistry* 1990;29:640-4.
62. Lackner C, Boerwinkle E, Leffert C, Rahmig T, Hobbs H. Molecular basis of apolipoprotein(a) isoform size heterogeneity as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Invest* 1991;87:2153-61.
63. Berg K, Dahlen G, Frick MH. Lp(a) lipoprotein and pre-beta-lipoprotein in patients with coronary heart disease. *Clin Genet* 1974;6:230-5.

64. Kostner GM, Avogaro P, Cazzolato G, Marth E, Bittolo-Bon G, Qunici GB. Lipoprotein Lp(a) and the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1981;38:51-61.
65. Armstrong V, Cremer P, Eberle E, Manke A, Schulze F, Wieland H, Kreuzer H, Seidel D. The association between serum Lp(a) concentration and angiographically assessed coronary atherosclerosis: dependence on LDL levels. *Atherosclerosis* 1986;62:249-57.
66. Hoefler G, Harmoncourt F, Paschke E, Mirtl W, Pfeiffer KH, Kostner GM. Lipoprotein Lp(a). A risk factor for myocardial infarction. *Arteriosclerosis* 1988;8:398-401.
67. Seed M, Hoppichler F, Reaveley D, McCarthy S, Thompson GR, Boerwinkle E, Utermann G. Relation of serum lipoprotein(a) concentration and apolipoprotein(a) phenotype to coronary heart disease in patients with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1990;322:1494-9.
68. Sandkamp M, Funke H, Schulte H, Kohler E, Assmann G. Lipoprotein(a) is an independent risk factor for myocardial infarction at a young age. *Clin Chem* 1990;36:20-3.
69. Genest J, Jr., McNamara JR, Ordovas JM, Jenner JL, Silberman SR, Anderson KM, Wilson PW, Salem DN, Schaefer EJ. Lipoprotein cholesterol, apolipoprotein A-I and B and lipoprotein (a) abnormalities in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:792-802.
70. Craig WY, Neveux LM, Palomaki GE, Cleveland MM, Hadrow JE. Lipoprotein(a) as a risk factor for ischemic heart disease: metaanalysis of prospective studies. *Clin Chem* 1998;44:2301-6.
71. Tate JR, Rifai N, Berg K, Couderc R, Dati F, Kostner G, Sakurabayashi I, Steinmetz A. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for the measurement of lipoprotein(a). Phase I. Evaluation of the analytical performance of lipoprotein(a) assay systems and commercial calibrators. *Clin Chem* 1998;44:1629-40.
72. Tate J, Berg K, Couderec R, Dati F, Kostner G, Marcovina S, Rifai N, Sakurabayashi I, Steinmetz A. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Standardization Project for the Measurement of Lipoprotein (a). Phase 2: Selection and properties of a proposed secondary reference material for lipoprotein(a). *Clin Chem Lab Med* 1999;37:949-58.