

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik  
Zentrallaboratorium

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität in Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

# **Interferenz eines homogenen Tests für LDL-Cholesterin durch Lipoprotein-X**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität  
Marburg vorgelegt von

**Nina Caprice Giehl**

aus Hachenburg

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps – Universität Marburg am:  
27.09.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund  
Referent: PD Dr. Dr. H. G. Wahl  
Korreferent: Prof. Dr. J. R. Schäfer

## Abkürzungen:

AAP	Aminoantipyrin = Aminophenazon
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterol-Acyl-Transferase
BQ	Beta-Quantification
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHOD-PAP	Cholesteroxidase - Phenol 4-Aminoantipyrine Peroxidase
CRMLN	Cholesterol Reference Method Laboratory Network
DCM	Designated Comparison Method
DGFF	Deutsche Gesellschaft zur Bekämpfung von Fettstoffwechselstörungen und ihren Folgeerkrankungen
DSBmT	N,N-bis (4-sulphobutyl)-m-toluidin-dinatrium
EAS	European Atherosclerosis Society
FS	Fettsäuren
GPO-PAP	Glycerinphosphatoxidase- Phenol-4-Aminoantipyrin Peroxidase
HDL	High Density Lipoprotein
HSDA	Natrium N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilin
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
KHK	Koronare Herzkrankheit
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipasen
Lp(a)	Lipoprotein(a)
Lp-X	Lipoprotein-X
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NIH	National Institutes of Health
NCEP	National Cholesterol Education Program
NCCLS	National Committee on Clinical Laboratory Standards
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PEG	Polyethylenglycol
PHN	Pseudohyponatriämie
PROCAM	Prospective Cardiovascular Münster
RiliBÄK	Richtlinien der Bundesärztekammer
UZ	Ultrazentrifugation
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis	I, II
Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	III-V
<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Cholesterinstoffwechsel und die Entstehung der Atherosklerose ...	2
1.1.1 Überblick über den Cholesterinstoffwechsel .....	2
1.1.2 Hypothesen der Atheroskleroseentstehung .....	5
1.2 Automatisierte homogene Testverfahren in der Laborroutine.....	8
1.3 Fragestellung und Zielsetzung .....	9
1.3.1 Cholestase als Ursache für Interferenzen bei homogenen Tests zur Cholesterindifferenzierung.....	9
1.3.2 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	12
<b>Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1 Probenmaterial .....	14
2.2 Untersuchungen zur Lipoproteindifferenz .....	15
2.3 Homogene Tests für Gesamtcholesterin, HDL und LDL .....	16
2.3.1 Bestimmung von Gesamtcholesterin .....	16
2.3.2 Bestimmung von HDL-Cholesterin .....	18
2.3.3 Bestimmung von LDL-Cholesterin .....	20
2.4 Sequentielle Ultrazentrifugation .....	22
2.5 Methodenvergleich .....	25
2.6 Bestimmung von Triglyceriden .....	25
2.7 Bestimmung von Bilirubin .....	26
2.8 Bestimmung und Aufstocken von Gallensäuren .....	26

2.9 Bestimmung der Lipoprotein-X Konzentration .....	27
<b>Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
3.1 Verlaufsbeobachtung .....	28
3.2 Vergleich von homogenem Test und Ultrazentrifugation .....	29
3.3 Vergleich der homogenen Assays Roche & Beckman .....	33
3.3.1 Proben mit unauffälligem Lipoproteinprofil.....	33
3.3.2 Proben mit auffälligem Lipoproteinprofil.....	34
3.4 Effekt von Bilirubin .....	37
3.5 Effekt von Triglyceriden .....	37
3.6 Effekt von Gallensäuren .....	38
3.7 Effekt von Lipoprotein-X .....	41
<b>Diskussion.....</b>	<b>43</b>
4.1 Historie und Gegenwart der Lipoproteinanalytik .....	43
4.2 Homogene automatisierte Tests .....	46
4.3 Interferenzen in der Cholesterindifferenzierung .....	47
4.4 Schlussfolgerung.....	49
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>53</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Danksagung

**Tabellenverzeichnis:**

<b>Tabelle 1:</b>	Überblick über die verschiedenen Lipoproteinklassen, Tabelle in Anlehnung an Schwandt P, Parhofer K: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen <sup>(21)</sup> .....4
<b>Tabelle 2:</b>	Risikobeurteilung der Cholesterinwerte im ‚ATP Panel III‘ <sup>(31, 32)</sup> des National Institutes of Health (NIH), National Cholesterol Education Program (NCEP).....7
<b>Tabelle 3:</b>	Qualitätsanforderungen nach CRMLN <sup>(56)</sup> und RiliBÄK <sup>(17)</sup> für Gesamtcholesterin.....17
<b>Tabelle 4:</b>	Mögliche Interferenzfaktoren des automatisierten CHOL Tests .....17
<b>Tabelle 5:</b>	Qualitätsanforderungen nach CRMLN <sup>(57)</sup> und RiliBÄK <sup>(17)</sup> für HDL-Cholesterin .....19
<b>Tabelle 6:</b>	Mögliche Interferenzfaktoren des automatisierten HDL Tests .....19
<b>Tabelle 7:</b>	Qualitätsanforderungen nach CRMLN <sup>(58)</sup> und RiliBÄK <sup>(17)</sup> für LDL-Cholesterin .....21
<b>Tabelle 8:</b>	Mögliche Interferenzfaktoren des automatisierten LDL Tests.....21
<b>Tabelle 9:</b>	Schematische Darstellung einzelner Ultrazentrifugationsschritte ...25

**Abbildungsverzeichnis:**

<b>Abbildung 1:</b>	Strukturformel des Cholesterins (C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O) .....2
<b>Abbildung 2:</b>	Durchführung der Ultrazentrifugation .....24
<b>Abbildung 3:</b>	Reproduzierbarkeit der Lipoproteindifferenz in der täglichen LDL-Verlaufskontrolle bei einem Patienten mit metastatischer Obstruktion des Ductus hepaticus. Gesamtbilirubin 0,15 mmol/L, Gallensalze 149 µmol/l, Lp-X 51,04 mg/dl .....28
<b>Abbildung 4:</b>	Methodenvergleich: HDL Ultrazentrifugation (UZ) und HDL-C Test [mg/dl]: Steigung 0,955, Achsenabschnitt 0,0376 nach Passing <sup>(61)</sup> und Bablok <sup>(5)</sup> .....29
<b>Abbildung 5:</b>	Methodenvergleich: HDL Ultrazentrifugation (UZ) und HDL-C Test: Median Bias 0.839 mg/dl, 95% CI -1.066 bis 2.744 mg/dl nach Bland und Altman <sup>(13, 14)</sup> .....30
<b>Abbildung 6:</b>	Methodenvergleich: LDL Ultrazentrifugation (UZ) und LDL-C Test [mg/dl]: Steigung 1,046, Achsenabschnitt 21,899 .....30

<b>Abbildung 7:</b>	Methodenvergleich: LDL Ultrazentrifugation (UZ) und LDL-C Test Roche: Median Bias -33,040 mg/dl, 95% CI -41,355 bis – 24,725 mg/dl nach Bland und Altman <sup>(13, 14)</sup> .....	31
<b>Abbildung 8:</b>	Methodenvergleich: Berechnetes VLDL [%] und IDL+VLDL/CHOL mittels Ultrazentrifugation (UZ): Steigung 0,811, Achsenabschnitt 0,069 nach Passing <sup>(61)</sup> und Bablok <sup>(5)</sup> .....	31
<b>Abbildung 9:</b>	Methodenvergleich: Berechnetes VLDL [%] und IDL+VLDL mittels Ultrazentrifugation (UZ) [mg/dl]: Median Bias 1,911 mg/dl, 95% CI -3,072 bis 6,893 mg/dl nach Bland und Altman ....	32
<b>Abbildung 10:</b>	Methodenvergleich CHOL (Roche) – CHOL (Beckman): Median Bias -2.706 mg/dl, 95% CI -7,215 bis 1,803 mg/dl nach Bland und Altman <sup>(13, 14)</sup> .....	33
<b>Abbildung 11:</b>	Methodenvergleich HDL-C (Roche) – HDLD (Beckman): Median Bias 0,831 mg/dl, 95% CI -0,584 bis 2,246 mg/dl nach Bland und Altman <sup>(13, 14)</sup> .....	33
<b>Abbildung 12:</b>	Methodenvergleich LDL-C (Roche) – LDLD (Beckman): Median Bias 1,626 mg/dl, 95% CI -3,045 bis 6,297 mg/dl nach Bland und Altman <sup>(13, 14)</sup> .....	34
<b>Abbildung 13:</b>	Methodenvergleich auffällige Proben CHOL (Roche) – CHOL (Beckman): Median Bias 8,152 mg/dl, 95% CI 1,727 bis 14,577 mg/dl nach Bland und Altman <sup>(13, 14)</sup> .....	34
<b>Abbildung 14:</b>	Methodenvergleich auffällige Proben HDL-C (Roche) – HDLD (Beckman): Median Bias -6,904 mg/dl, 95% CI -8,347 bis 5,461 mg/dl nach Bland und Altman <sup>(13, 14)</sup> .....	35
<b>Abbildung 15:</b>	Methodenvergleich auffällige Proben LDL-C (Roche) – LDLD (Beckman): Median Bias -24,452 mg/dl, 95% CI -31,400 bis 17,505 mg/dl nach Bland und Altman <sup>(13, 14)</sup> .....	35
<b>Abbildung 16:</b>	Reagenzienvergleich: Der Box-Whisker-Plot zeigt in den Proben mit auffälligem Lipoproteinprofil das Verhältnis der prozentualen Summe aller Lipoproteinfraktionen zum Gesamtcholesterin.....	36
<b>Abbildung 17:</b>	Korrelation zwischen Gesamtbilirubin (mmol/l) und Bias der LDL Tests [mg/dl]: R= 0,17, 95% CI -0,20 bis 0,50 nach Passing <sup>(61)</sup> und Bablok <sup>(5)</sup> .....	37

- Abbildung 18:** Keine Korrelation zwischen Triglyceriden [mg/dl] und Bias des LDL-C Tests mit der Ultrazentrifugation [mg/dl]:  $R= 0,01$ , 95% CI -0,25 bis 0,26,  $p= 0,95$  nach Passing <sup>(61)</sup> und Bablok <sup>(5)</sup> .....38
- Abbildung 19:** Keine Korrelation zwischen Gallensäuren [ $\mu\text{mol/l}$ ] und der Lipoproteinlücke [mg/dl] (gemessen mit Hitachi 917, Roche Diagnostics):  $R= -0.15$ , 95% CI -0,48 bis 0,22 .....39
- Abbildung 20:** Keine Korrelation zwischen Gallensäuren [ $\mu\text{mol/l}$ ] und Bias der LDL Tests [mg/dl]  $R= 0.09$ , 95% CI -0,24 bis 0,40 .....39
- Abbildung 21:** Kein Effekt der zugesetzten Gallensalze [ $\mu\text{mol/l}$ ] mit unterschiedlicher Einwirkdauer und -konzentration auf die LDL und HDL Tests [mg/dl] .....40
- Abbildung 22:** Korrelation zwischen LP-X [mg/dl] und Bias der LDL Tests [mg/dl]:  $R= 66$ , 95% CI 0,39 bis 0,82,  $p<0,0001$  .....41
- Abbildung 23:** Korrelation zwischen LP-X [mg/dl] und Bias der HDL Tests [mg/dl]:  $R= -0,13$ , 95% CI -0,46 bis 0,23,  $p= 48$  .....42
- Abbildung 24:** Variation von Lp-X in Abhängigkeit der Cholestase-Pathogenese (Wieland 1982 <sup>(91)</sup>) .....52



## Einleitung

Atherosklerose (griech: athära= Grütze, skleros= hart) ist eine weltweite Erkrankung, bei der Arterienwandveränderungen in einem schleichenden und lange symptomlosen Prozess zu Gewebeischämien in Form von Gefäßeinengungen oder embolischen Ereignissen führen. Es resultieren schwerwiegende Erkrankungen wie die Koronare Herzerkrankung (KHK), Angina Pectoris, Schlaganfall, periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK) und Niereninsuffizienz.

In der aktuellen Auflistung des Statistischen Bundesamtes aller Sterbefälle in Deutschland im Jahr 2009 (mit insgesamt 854.544 Personen) stehen Herz-Kreislauf-Erkrankungen nach wie vor an erster Stelle mit 356.462 Personen. Die wichtigste Untergruppe ist die der KHK (135.413)<sup>(80)</sup>. In diversen Studien wurden als primär begünstigend Fettstoffwechselstörungen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Zigarettenkonsum eingestuft. Unter anderem zeigte ‚The British Regional Heart Study‘ (2008)<sup>(36)</sup> eine verminderte Herzinfarkt-Inzidenz in einer Gruppe von 7735 Männern innerhalb von 25 Jahren bei reduziertem Nikotin-Konsum (23%), niedrigem Blutdruck (13%), einer Reduktion der ‚Non-High-Density‘ -Lipoproteine (10%) und einem Anstieg des High-Density-Lipoprotein (HDL) mit 10%. Auch erhöhte Werte der lipoproteinassoziierten Phospholipase A2 (Lp-PLA2)<sup>(84)</sup> und Lipoprotein (a), ein dem LDL-C ähnliches Lipoprotein<sup>(41)</sup>, gelten ebenso als begünstigend für die Koronare Herzkrankheit.

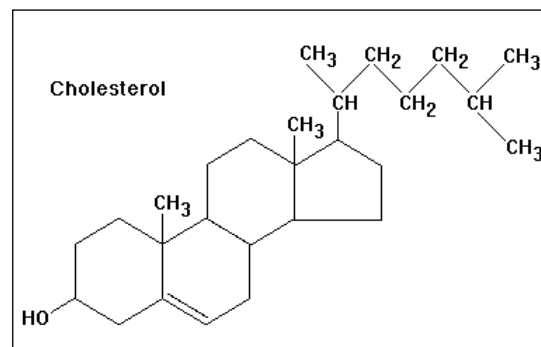
Zur Feststellung des individuellen kardiovaskulären Risikos ist vor allem eine genaue Cholesterindifferenzierung in der Laborroutinediagnostik essentiell. Moderne biochemische Analyseautomaten und die zugehörigen homogenen Reagenzien versprechen eine schnelle, automatisierte und kostengünstige Bestimmung. In dieser Arbeit werden mögliche Störfaktoren einer solchen automatisierten Cholesterindifferenzierung näher untersucht.

Insbesondere die Anwesenheit des atypischen Lipoprotein-X (Lp-X) spielt dabei eine bedeutende Rolle.

## 1.1 Cholesterinstoffwechsel und die Entstehung der Atherosklerose

### 1.1.1 Überblick über den Cholesterinstoffwechsel

Der menschliche Tagesbedarf von Cholesterin beträgt etwa 1g und entstammt je zur Hälfte aus der Nahrung und der körpereigenen Biosynthese in Darm, Haut und vor allem in der Leber<sup>(44)</sup>. Knapp 80% des Gesamtcholesterins sind als Speicher- und Transportform mit Fettsäuren verestert. Das Steroid kann aufgrund seiner Struktur (Abbildung 1) als polyzyklischer Alkohol auch als Cholesterol bezeichnet werden. Der größte Teil des Cholesterins dient zur Stabilisierung der Zellmembran, ein geringer Teil dient als Ausgangssubstanz für Steroidhormone<sup>(44)</sup>.



**Abbildung 1:** Strukturformel des Cholesterins (C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O)

Nach Nahrungsaufnahme wird Cholesterin in die Dünndarmmukosa aufgenommen und mit Hilfe der Acyl-CoA-Cholesterin-Acyl-Transferase (ACAT) verestert. Der Transport durch den Blutkreislauf geschieht aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von Cholesterinester und Triglyceriden im Kern verschiedener Lipoproteine. Die Hülle dieser mizellenähnlichen Strukturen wird durch Verbindungen wie Proteine und Phospholipide gebildet. Bepackt mit Cholesterinpartikeln verlassen die größten der Lipoproteine – die Chylomikronen – den Darm. Während der Zirkulation setzen endotheliale Lipoproteinlipasen (LPL) daraus Fettsäuren (FS) frei.

Die verkleinerten Chylomikronen-Remnants werden zur peripheren Energieversorgung hepatisch in triglyceridreiche Very-Low-Density-Lipoproteins (VLDL) umgebaut.

Es erfolgt unter Einwirkung von LPL teilweise der Abbau über Intermediate-Density-Lipoproteins (IDL) zu LDL. Etwa 80% des gesamten Plasmacholesterins wird damit hauptsächlich von der Leber zu den Geweben transportiert. Untergruppen dieser Lipoproteinklasse unterscheiden sich im Triglyceridanteil und können mit einem höheren Risiko für koronare Herzerkrankungen einhergehen („small dense LDL“) <sup>(63)</sup>.

Der auftretende Membranüberschuss der IDL und der Chylomikronen-Remnants kommt dem Aufbau von HDL zugute. Der Überschuss an freiem Cholesterin peripherer Zellen überträgt sich durch die Signalwirkung von Apoprotein-A<sub>I</sub> auf die HDL-Partikel. Diese sind somit wesentlicher Teil der hepatobiliären Elimination und gelten als arterioprotektiv.

Die Anzahl spezieller LDL-Rezeptoren auf der Zellmembran wird über einen negativen Feedback-Mechanismus geregelt. Je nach Cholesterinbedarf der Zelle interagieren Rezeptor und Apoprotein B-100 der LDL-Partikeloberfläche. Etwa 70% des zirkulierenden LDL Cholesterins wird auf diese Weise entfernt. Die verbleibenden 30% werden nach chemischer Modifikation unkontrolliert über einen LDL-Rezeptor-unabhängigen Weg (Multiligandenrezeptoren, z.B. Scavengerrezeptoren der Makrophagen) beseitigt <sup>(63)</sup>. Ein Beispiel für einen Multiligandenrezeptor ist Sortilin: Einer Metaanalyse mit 4 Fall-Kontroll Studien aus dem Jahr 2009 zufolge ist ein einzelner Nukleotid Polymorphismus (SNP) „rs599839“ auf dem Chromosom 1p13.3 mit einer reduzierten LDL-C-Konzentration und einem geringeren kardiovaskulären Risiko assoziiert. Dieser Effekt scheint auf einer ansteigenden Expression des Multiligandenrezeptors Sortilin zu beruhen, der wiederum für eine vermehrte LDL-Aufnahme in Leberzellen verantwortlich zu sein scheint <sup>(52)</sup>.

Das Lp(a) hat ebenfalls eine ähnliche Zusammensetzung wie LDL. Bei hoher möglicher Schwankungsbreite in der europäischen Bevölkerung (Tabelle 1) bleibt der individuelle (meist eher niedrige) Wert sehr konstant<sup>(46)</sup>. Medikamentös oder durch konservative Maßnahmen wie Sport ist der genetisch determinierte Plasmaspiegel von Lp(a) nur schwer zu beeinflussen. Er gilt als unabhängiger Risikofaktor der KHK insbesondere bei gleichzeitiger Erhöhung des LDL-C. Erhöhte Werte finden sich bei Niereninsuffizienz und Akut-Phase-Zuständen (z.B. Infektionen, Herzinfarkt). Dieser Umstand lässt

die Niere als möglichen Abbauort vermuten<sup>(46)</sup>. In der cholestatischen Stoffwechselsituation wird bisher keine Änderung der Plasmakonzentration von Lp(a) beschrieben.

Einen Überblick über die verschiedenen Lipoproteinklassen gibt Tabelle 1.

LP	Dichte (kg/l)	Größe (nm)	Haupt-apo-protein	Masse (MDa)	Elektrophorese	Zusammensetzung					Männer g/l	Frauen g/l					
						PR	PL	FC	CE	TG							
CM	<1,000	<10 <sup>4</sup>	A <sub>IV+V</sub> , B <sub>48</sub> , C <sub>I-III</sub> , E, H	> 150	Keine	2	5	1	2	90	<0,1	<0,1					
VLDL	<1,005	50	A <sub>V</sub> , B <sub>100</sub> , C <sub>I-IV</sub> , E, G	5-130	Prä-β	10	16	7	13	54	0,5-2,0	0,5-1,5					
IDL	<1,019	30	B <sub>100</sub> , E	3,5	Prä-β/β	17	20	9	34	20							
Lp-Y	<1,063	30-40	B, C	3-5		27	20	8	10	35							
Lp-X	<1,063	30-50	C <sub>I-III</sub> , D Albumin im Kern	5-10	β	6	61	25	5	3	<10mg/dl	<10mg/dl					
LDL	<1,063	21	B <sub>100</sub>	2,5	β	23	21	11	41	4	2,0-3,5	2,0-3,5					
Lp(a)	<1,09	25	Apo(a), B <sub>100</sub>	5,5	Prä-β	31	19	8	37	5	0,01-0,5	0,01-0,5					
HDL <sub>E</sub> bei Tieren	<1,125	12	A, E	0,5	Prä-β <sub>1</sub>	HDL zusammen:  42-72 20-35 2-5 5-15 1-5					<0,05	<0,05					
HDL <sub>2</sub>	<1,125	10	A, C, F, J, M	0,36	α											0,5-1,0	0,5-1,5
HDL <sub>3</sub>	<1,210	8	A <sub>III</sub> , C, D, F, J, L, M	0,2	α											1,0-2,0	1,0-2,0
VHDL	<1,25	7	A, C, D, E	0,15	α											0,1-0,2	0,1-0,2
<b>Lipoproteine, ChyloMikronen, PRotein, PhosphoLipide, Freies Cholesterin, CholesterinEster, TriGlyceride</b>																	

**Tabelle 1:** Überblick über die verschiedenen Lipoproteinklassen, Tabelle in Anlehnung an Schwandt P, Parhofer K: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen<sup>(21)</sup>

### 1.1.2 Hypothesen der Atheroskleroseentstehung

Der Historie zufolge beschrieben 1977-1984 J.L. Goldstein und M.S. Brown<sup>(15, 16, 30)</sup> einen LDL-Rezeptor-unabhängigen und nicht regulierten Eliminationsweg des LDL-C über Scavengerrezeptoren auf den Oberflächen von Makrophagen. Nach ihrer „Lipoprotein induced atherosclerosis“ –Hypothese führt dies zu einer ungehemmten Akkumulation von Cholesterin in Makrophagen der Gefäßwände. Es folgt eine Transformation zu Schaumzellen.

Nach dem heutigen Kenntnisstand wird die Hypothese „Response to injury“ von Russell Ross (1976)<sup>(70,71)</sup> der Atherogenese zu Grunde gelegt. Die oben beschriebene endotheliale Dysfunktion führt zur Ausbildung von Schaumzellen, welche durch die Sezernierung von Wachstumsfaktoren die subendothelialen Muskelzellen zur Proliferation anregen. Es entstehen sogenannte „fatty streaks“ mit Schichten aus Makrophagen, Schaumzellen und glatten Muskelzellen. Es bilden sich daraus größere Plaques mit bindegewebiger Kappe um einen Lipidkern aus abgestorbenen Schaumzellen, die weiter zur schrittweisen Einengung des Gefäßlumens führen<sup>(71)</sup>. Eine durch den ständigen Druck des Blutstroms plötzlich auftretende Ruptur aktiviert die Gerinnungskaskade und bewirkt einen raschen Verschluss des Gefäßlumens.

Nach der von Daniel Steinbergs 1981-1984 formulierten Oxidationstheorie<sup>(81)</sup> ist die oxidative Umwandlung von LDL für die Gefäßschädigung ursächlich. Dies erklärt jedoch nicht die in vivo gemessenen niedrigen Spiegel von oxidiertem LDL in atherosklerotischen Plaques oder die vorgefundenen Ablagerungen von entzündlichem Komplement. Auch konnte bisher die Wirksamkeit von Antioxidantien in Therapiestudien nicht belegt werden.

Mainzer Forscher hingegen haben einen ganz neuen Ansatz der Atherogenese entwickelt<sup>(10, 11, 12)</sup>. Nach ihrem Konzept wird zunächst subendothelial eingewandertes LDL enzymatisch umgebaut. Danach wirkt dieses CRP-bindend und komplementaktivierend. Angelockte Makrophagen nehmen LDL-C auf. Aus diesen Schaumzellen wird das darin enthaltene Cholesterin nun HDL-assoziiert aus der Gefäßwand entfernt.

Wenn das physiologische Gleichgewicht gestört wird, kommt es zu einer Dysbalance der Abräumprozesse. Ursachen sind demnach ein überhöhtes Einsickern von LDL-C in das Gewebe durch überhöhte LDL-Plasmaspiegel bei zu hohem Blutdruck. Zum anderen kann eine Störung des Abtransportes durch Verminderung des HDL-C vorliegen. Die klassischen Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes und Infektionen begünstigen die Pathophysiologie und verursachen dabei eine Entzündungsreaktion in den Gefäßwänden mit den bekannten pathologischen Folgen der Plaquebildung. Aufgrund des letzten Endes monokausal ausgelösten pathologischen Prozesses wird eine optimale Einstellung des LDL/HDL- Quotienten  $<2,5$  und eine Einstellung des arteriellen Hypertonus empfohlen. Hierbei rückt die prognostische Bedeutung und Bewertung des Gesamtcholesterinwertes zunächst in den Hintergrund. Die Erkrankung fängt laut Prof. Bhakdi bereits bei Jugendlichen an und erfordert daher frühzeitig eine entsprechende Prophylaxe.

Gesamtcholesterin von 200 mg/dl stellt zwar einen Schwellenwert dar, dieser ist jedoch alters-, bevölkerungs- und geschlechtsabhängig und hat erst in Extrembereichen  $<160$  mg/dl und  $>320$  mg/dl eine Vorhersagekraft für ein koronares Risiko. Um ein individuelles kardiovaskuläres Risiko feststellen und therapieren zu können, muss also neben Cholesterin „[...] die HDL- und LDL-Cholesterinkonzentration mitbestimmt werden. LDL-Cholesterin ist die atherogene Hauptkomponente, HDL-Cholesterin ist negativ mit dem Auftreten der koronaren Herzkrankheit assoziiert“<sup>(85)</sup>.

Es stellt sich generell die Frage, weshalb gerade das Herz anfälliger für Gefäßeinengungen und -verschlüsse ist, als das übrige Gefäßsystem des Körpers. Die Marburger Hypothese sieht einen Erklärungsansatz in dem vermehrten Fettsäureverbrauch des Herzens zur Deckung des eigenen Energiebedarfs. Es konnte gezeigt werden, dass gerade Fettsäuren über die Aktivierung der Proteinphosphatase Typ 2C zur Apoptose von Endothelzellen führen und dadurch wahrscheinlich ein weiterer Triggermechanismus im Rahmen der Dyslipoproteinämie ist<sup>(73)</sup>.

Auch epidemiologische große Kohortenstudien wie die PROCAM-Studie (Prospective Cardiovascular Münster) oder die Framingham-Studie aus den USA belegen den im Vergleich zum Gesamtcholesterin hohen prädiktiven Wert

der HDL- und LDL-Cholesterinfraktionen für das KHK-Risiko. Nach den Leitlinien von Fachgremien wie der EAS (European Atherosclerosis Society) und dem NCEP (National Cholesterol Education Program) werden zur atherogenen Risikoeinstufung verschiedene LDL-Zielwerte angegeben – einen Überblick gibt Tabelle 2.

<u>LDL-Cholesterin</u>	<b>&lt; 70 mg/dl</b> < 100 mg/dl < 130 mg/dl < 160 mg/dl ≥190	<b>Niedrig/ Optimal</b> Fast optimal Grenzwertig hoch Hoch Sehr hoch
<u>Gesamtcholesterin</u>	<b>&lt;200</b> 200-239 ≥240	<b>Niedrig/ Erwünscht</b> Grenzwertig hoch Hoch
<u>HDL-Cholesterin</u>	<b>≥60</b> <40	<b>Hoch/ Erwünscht</b> Niedrig

**Tabelle 2:** Risikobeurteilung der Cholesterinwerte im ‚ATP Panel III‘<sup>(31, 32)</sup> des National Institutes of Health (NIH) aus dem National Cholesterol Education Program (NCEP)

Basierend auf der Erkenntnis eines linear ansteigenden relativen Risikos für KHK in Abhängigkeit von LDL-Cholesterin wird das therapeutische Ziel folgendermaßen definiert: Bei Patienten mit mäßigem Risiko soll ein LDL-Spiegel von <130 mg/dl erreicht werden, bei Patienten mit hohem Risiko von <100 mg/dl und mit sehr hohem Risiko sogar von <70 mg/dl<sup>(31, 32)</sup>.

Die DGFF (Deutsche Gesellschaft zur Bekämpfung von Fettstoffwechselstörungen und ihren Folgeerkrankungen) differenziert die Therapieziele einer koronaren Herzkrankheit anhand des Globalrisikos, welches sich anhand des PROCAM Scores ermitteln lässt. Die Therapiezielwerte des LDL-Cholesterins liegen je nach Risiko bei den primären Hypercholesterinämien <100 mg/dl bis <160 mg/dl. Bei den gemischten Hyperlipidämien werden Triglyzeridwerte <150 mg/dl gefordert, das LDL-Cholesterin sollte risikobezogen hier auf <160 mg/dl, bei hohem Risiko sogar auf <70 mg/d gesenkt werden.

Ein weiterer Beleg für den Effekt eines niedrigen LDL-Spiegels zeigen Deedwania et. al in einer 4,9 Jahres-Follow-Up Therapiestudie 2006 (TNT). Dort wurden große kardiovaskuläre Ereignisse von Patienten mit KHK und Metabolischem Syndrom unter lipidsenkender Therapie untersucht. In der Gruppe mit einem durchschnittlichen LDL-Wert von 72,6 mg/dl traten um ca. 3,5% weniger Ereignisse wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall auf wie bei den Patienten mit einem durchschnittlichen LDL-Wert von 99,3 mg/dl <sup>(19)</sup>.

Mit der Aufklärung über Pathogenese und Folgen der Atherosklerose versuchen zahlreiche nationale und internationale Organisationen die Zahl der Betroffenen zu senken. Medikamentöse <sup>(3, 4, 19, 22)</sup> und konservative Therapiemaßnahmen (z.B. Sport) stehen hier im Vordergrund.

## 1.2 Automatisierte homogene Testverfahren in der Laborroutine

Historisch wurden verschiedene analytische Methoden für die Messung von Cholesterin und Lipoproteinen vorgeschlagen: 1885/89 nach Liebermann und Burchard <sup>(18, 51)</sup>, 1952 nach Abell und Kendall <sup>(1)</sup>, 1974 nach Roeschlaue und Allain <sup>(2, 65)</sup>, 1972 LDL-Berechnung nach Friedewald <sup>(26)</sup> und HDL-/ LDL-Fällung. Die Referenzmethode zur genauen Messung der Fettstoffwechsel-Parameter ist die sequentielle Ultrazentrifugation, die jedoch aufgrund des enormen Aufwandes für die tägliche Routinediagnostik ungeeignet ist. Hier werden heutzutage fast ausschließlich homogene Tests eingesetzt.

Auf Reaktionsabläufe und Störfaktoren wird in Kapitel 2.3 dieser Arbeit näher eingegangen. Ein ‚Test‘ [engl: Assay] bedeutet heute in der Labormedizin einen standardisierten Reaktionsablauf zum Nachweis einer Substanz mit einer spezifischen Methode. ‚Homogen‘ ist der Test dann, wenn weder geräteexterne Vorbehandlung der Proben, noch Zentrifugationsschritte erforderlich sind. Ein Jahrhundert nach der Entwicklung der Cholesterinbestimmung von Liebermann und Burchard<sup>(18, 51)</sup> erstellten die ‚Centers for Disease Control and Prevention‘ (CDC) mit dem ‚Cholesterol Reference Method Laboratory Network‘ (CRMLN) Kriterien, mit denen eine objektive Beurteilung der analytischen Qualität homogener Testsysteme



möglich ist. Instrumente und Reagenzien verschiedener Hersteller werden durch angegebene Fehlergrenzen einer Referenzmethode verglichen und zertifiziert. Die Laboratorien in Deutschland müssen dabei die Vorgaben der ‚Richtlinien der Bundesärztekammer‘ (RiliBÄK) erfüllen (siehe 2.3).

### 1.3 Fragestellung und Zielsetzung

#### 1.3.1 Cholestase als Ursache für Interferenzen bei homogenen Tests zur Cholesterindifferenzierung

Die Funktion der Hepatozyten ist entscheidend für den Cholesterinstoffwechsel (Kapitel 1.1.1) und die Homöostase der Lipoproteine im Plasma. Durch Störungen wie bei der Cholestase kommen eine veränderte Synthese, Sekretion und Aufnahme zustande. Gallengängige Lipide unterliegen einem Reflux in die Leber und nachfolgend in die Blutzirkulation statt einer Sekretion ins Darmsystem. Eine Dyslipoproteinämie sowie die Bildung neuer Lipoproteine können durch die Reduktion des Apolipoprotein AI, sowie der Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase(LCAT)- und der Triglyzeridlipase-Aktivität ausgelöst werden<sup>(21)</sup>.

Kennzeichnend für eine Cholestase ist die Reduktion des Galleflusses, wobei Bilirubin und Gallensäuren durch eine mechanische Obstruktion oder eine funktionelle Einschränkung des Galleexkretionsmechanismus retiniert und vermehrt ins Blut abgegeben werden.

- Gallensäuren

Gallensäuren werden aus Cholesterin in der Leber synthetisiert. Sie liegen in der Galle durch den alkalischen pH-Wert hauptsächlich in Anionenform vor (Gallensalze) und sind mit Aminosäuren konjugiert. Sie gelangen während der Verdauung mit der Galle in den Darm. Dort emulgieren sie Nahrungsfette und werden nach Reabsorption zusammen mit den Lipiden über das Ileum erneut der Leber zugeführt.

Die Gallensäure-Konzentration ist bei Virushepatitis, alkoholtoxischer Hepatitis, Leberzirrhose, PBC, Cholestase und zystischer Fibrose erhöht. Durch deren Bestimmung ist die Frühdiagnose einer Leberzellfunktion möglich. Der Normwert für Erwachsene liegt unter 6  $\mu\text{mol/l}$ , eine Interferenz in der Cholesterinbestimmung ist bis jetzt nicht bekannt.

- Bilirubin

Bilirubin wird in unkonjugierter lipophiler Form (= indirektes Bilirubin) als Abbauprodukt des Hämoglobins aus gealterten Erythrozyten in Leber und Milz gebildet. Ein Transport im Blut ist nur durch die Kopplung an Albumin möglich. Durch die Konjugation an Glucuronsäure liegt es in wasserlöslicher Form vor (direktes Bilirubin). So kann es zunächst mit der Galle in den Darm ausgeschieden und über Zwischenstufen zu 70% über den enterohepatischen Kreislauf wiederaufgenommen werden. Langfristig kann durch Verschlussikterus ein Anstieg über den Normwert von 1,2 mg/dl (21  $\mu\text{mol/l}$ ) zur Gelbsucht (lat: Ikterus) mit Ablagerungen in Haut, Geweben und Basalganglien führen. Einen Einfluss von erhöhtem Bilirubin bei der Cholesterinmessung mit homogenen Assays belegten Glick et. al in einer Studie von 1986<sup>(28)</sup>. Laut Herstellerangaben der Fa. Roche/Hitachi<sup>(66)</sup> und Beckmann Coulter<sup>(7)</sup> stören erhöhte Werte ab 25 mg/dl (428  $\mu\text{mol/L}$ ) von konjugiertem und ab 10 mg/dl (171  $\mu\text{mol/L}$ ) von unkonjugiertem Bilirubin<sup>(66)</sup> die Differenzierung.

- Lipoprotein-X

Durch die Ultrazentrifugation konnten unter cholestatischen Bedingungen neue Lipoproteinpartikel dem Dichtebereich von LDL zugeordnet werden, 1967 wurde zum ersten Mal das 30-50nm große Lipoprotein-X beschrieben<sup>(74)</sup>. Lp-X ist ein abnorm scheibenförmiges Lipoprotein, welches zusammen mit der LDL-Fraktion bei der Ultrazentrifugation (1.019-1.063 g/ml) isoliert werden kann. Es finden sich Albumin im Kern<sup>(75)</sup> und Apolipoproteine C und D in der Hülle<sup>(76)</sup>, jene dienen als Aktivator der LCAT. Die drei Unterformen von Lp-X unterscheiden sich nur gering durch ihre Dichte und die Zusammensetzung der Apolipoproteine. Physikochemisch ist es im Vergleich zu den anderen

Lipoproteinen reich an Phospholipiden und unverestertem Cholesterin (siehe Tabelle 1). Mit Intensität der Cholestase nimmt die Konzentration von Lp-X zu, aber auch bei Erkrankungen wie familiärem LCAT-Mangel oder anderen hepatozellulären Lebererkrankungen wurde Lp-X gefunden<sup>(21)</sup>.

Nachgewiesen wurde Lp-X in den Gallenkanalikuli, zytoplasmatischen Vakuolen von Hepatozyten und auch im Disse Raum. Tierexperimentelle Beobachtungen lassen vermuten, dass Lp-X oder eine Vorstufe bereits in der Galle vorliegt, die dann unter pathophysiologischen Bedingungen bei Verschlussikterus durch transzellulären Transport in den Disse Raum und dann in die Zirkulation übergeht<sup>(21)</sup>. In der Galle lässt sich jedoch eine Lp-X Konzentration nicht direkt nachweisen. Um die o.g. Theorie zu untermauern, inkubierten Manzato et al. im Jahr 1976 Albumin und Lp-X-negatives Serum mit Galle<sup>(53)</sup>. Lp-X wurde daraufhin messbar und ist somit umgekehrt ein sehr spezifischer Marker für eine Cholestase, da hierbei Galleflüssigkeit mit dem Serum in Kontakt kommt<sup>(91)</sup>.

Der Abbau des atypischen Lipoproteins findet im retikuloendothelialen System der Milz und Leber sowie auch über die Niere statt. Studien von Fei<sup>(25)</sup> und Garcia-Hejl<sup>(27)</sup> gaben Hinweise, dass auch erhöhte Werte von Lipoprotein-X die Cholesterindifferenzierung verändern können.

- Pseudohyponatriämie

Bei einem Verschlussikterus kann sich durch Anstieg des Lp-X eine PHN entwickeln, dabei bleibt das Serum klar<sup>(49)</sup>. Eine solche Pseudohyponatriämie wurde auch bei Patienten mit einer chronischen graft-versus-host Reaktion der Leber nach allogener Knochenzelltransplantation beobachtet und konnte auf eine durch Lp-X bedingte Hypercholesterinämie zurückgeführt werden. Durch mangelnde Nachbeobachtungszeit konnte jedoch in dieser Studie eine Aussage über die Risikoentwicklung für vaskuläre Erkrankungen nicht getroffen werden<sup>(87)</sup>.

Eine Pseudohyponatriämie (PNH) ist eine nicht reale, sondern messtechnisch bedingte falsch niedrige Natriumkonzentration. Sie kann vor allem bei starkem Anstieg von Lipiden oder Proteinen ausgelöst werden. Der Anteil des Natriums am Gesamtplasma ist zwar vermindert, in Bezug auf das Plasmawasser jedoch normal.

- Lipoprotein Y

Das 40nm große Lipoprotein Y ist wahrscheinlich ein intermediäres Lipoprotein des Chylomikronenabbaus. Kostner et al. beschrieben eine Kumulation dieses pathologischen Lipoproteins anhand der Elektrophorese im Plasma ebenfalls bei cholestatischen Stoffwechselsituationen<sup>(45)</sup>. Bisher gab nur eine Studie einen ungenauen Hinweis auf eine mögliche Interferenz bei der homogenen automatisierten Lipoproteindifferenzierung<sup>(39)</sup>.

### 1.3.2 Ziele der vorliegenden Arbeit

Auf der Grundlage genauer Hyperlipoprotein- und Cholesterinbestimmung ist eine Risikoeinschätzung und adäquate Therapie zur Vermeidung von kardiovaskulären Ereignissen möglich. In der täglichen automatisierten Routinemessung der Fettstoffwechselfparameter wurden wiederholt -trotz Einhaltung der engen Qualitätsvorgaben der RiliBÄK- bei Verwendung eines 2. Generations-LDL-Tests im akkreditierten Laboratorium der Universität Marburg in manchen Serumproben implausibel niedrige LDL-Konzentrationen gemessen. Es bestanden unerklärliche Differenzen bis zu 160 mg/dl zwischen der Summe der automatisiert bestimmten Cholesterinfraktionen und dem Gesamtcholesterin.

Dieses Phänomen wiederholte sich auch in täglichen Verlaufskontrollen anonymisiert ausgewählter Patienten. Hauptsächlich waren Proben von Patienten mit gestörter Leberfunktion betroffen.

Während der Cholestase ist der Abbau der Lipoproteine durch hepatozelluläre Insuffizienz erschwert, die Produktion bleibt jedoch weiterhin konstant. Gerade die LDL-C Konzentration ist in dieser Stoffwechselsituation oder bei primär biliärer Zirrhose tendenziell erhöht <sup>(33, 40, 43, 72)</sup>. Umso unerklärlicher war die Lipoproteinlücke der einzelnen addierten Lipoproteinfraktionen zum Gesamtcholesterin.

In dieser Arbeit wurde die mögliche Interferenz der cholestaseassoziierten Parameter Bilirubin, Gallensalze und Lp-X bei der automatisierten enzymatischen Lipoprotein-Bestimmung untersucht. Dabei diente das Referenzverfahren der sequentiellen Ultrazentrifugation als auch ein anderes homogenes automatisiertes Messsystem zur Überprüfung und Einschätzung der vorliegenden unerklärlichen Lipoproteinlücke.

## Material und Methoden

### 2.1 Probenmaterial

Es wurden insgesamt 223 venös entnommene Heparinplasmaproben (158 mit implausiblem Cholesterinprofil und 65 mit normalem Cholesterinprofil) als Restmaterial gesammelt und anonymisiert asserviert. Darunter fanden sich auch Verlaufsproben mehrerer Patienten.

Die Proben wurden nach den aktuellen Empfehlungen des National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS) bei  $-30^{\circ}\text{C}$  eingefroren<sup>(56, 57, 58)</sup> und nach dem Auftauen erneut mit den homogenen Tests untersucht.

Nach unserer Definition lag eine implausible Cholesterindifferenzierung des Roche Tests vor, wenn die Summe HDL + LDL + VLDL weniger als 70% des Gesamtcholesterins betrug. Dabei wurde der VLDL-Wert nach der Friedewald-Formel<sup>(26)</sup> berechnet.

Implausible Cholesterindifferenzierung, wenn:

$\text{VLDL-C}^{\blacksquare} + \text{HDL-C}^{\square} + \text{LDL-C}^{\square} < 70\% \text{ des Gesamtcholesterins}$

- nach Friedewald<sup>(26)</sup>:  $\text{VLDL} = \text{Triglyceride} : 5$
- gemessen mit den homogenen Tests: ‚LDL-C‘ und ‚HDL-C‘ (Roche Diagnostics, Mannheim)

Den Informationsblättern der Testreagenzien zufolge stören erhöhte Werte für Bilirubin und Triglyceride sowie hämolytische Proben die Cholesterindifferenzierung<sup>(66, 67, 68)</sup>. Nähere Angaben hierzu finden sich in Kapitel 2.3 - Homogene Tests für Gesamtcholesterin, HDL und LDL. Serumproben mit Bilirubin  $>39 \text{ mg/dl}$  ( $667 \mu\text{mol/l}$ ), Triglyceride  $>400 \text{ mg/dl}$  und starke hämolytische Proben (Hämoglobin  $>1500 \text{ mg/dl}$  bzw.  $931 \mu\text{mol/l}$ ) wurden von der Studie ausgeschlossen.

## 2.2 Untersuchungen zur Lipoproteindifferenz

Es konnten aufgrund des begrenzten Probenvolumens nicht alle 223 Proben, insbesondere nicht die 158 mit auffälligem Lipoproteinprofil, jeder Untersuchung zugeführt werden. Zur Klärung der Lipoproteindifferenz wurde wie folgt vorgegangen:

- Von einer Person wurden 7 Verlaufskontrollen des Lipoproteinprofils angefertigt, um die Reproduzierbarkeit der beobachteten Lipoproteinlücke zu testen (Kap.3.1).
- Mit der sequentiellen Ultrazentrifugation als Referenzmethode erfolgte bei 83 auffälligen Proben die direkte Bestimmung der Lipoproteinlücke, die mit der Berechnung nach Friedewald und der automatisierten Bestimmung verglichen wurde (Kap.3.2).
- 108 auffällige und 65 unauffällige Cholesterinprofile wurden durch zwei homogene Tests untersucht, die jeweils anderen Reaktionsprinzipien unterliegen (Kap.3.3).
- Es wird eine Korrelation zwischen Lipoproteinlücke und den Bilirubin- und Triglyceridkonzentration überprüft (Kap.3.4 und 3.5).
- Die Gallensalz-Konzentration wurde in 30 auffälligen Proben bestimmt. Zusätzlich wurden unauffällige Proben mit Gallensalzen unterschiedlicher Konzentration und Einwirkzeit aufgestockt, um den Einfluss auf die Lipoprotein-Differenzierung zu erforschen (Kap.3.6).
- Lipoprotein-X wurde in 30 auffälligen Proben durch ein externes Labor gemessen und auf eine Korrelation zur Lipoproteinlücke hin untersucht (Kap.3.7).

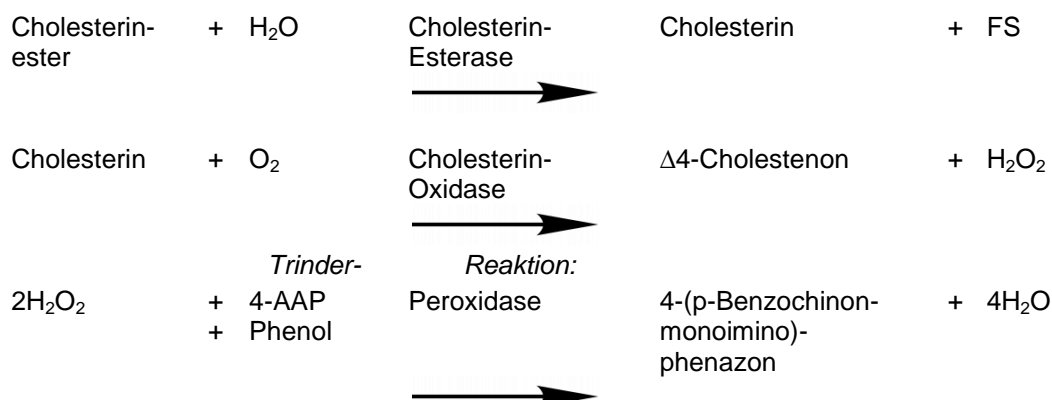
## 2.3 Homogene Tests für Gesamtcholesterin, HDL und LDL

Die Proben werden vollautomatisch in die Küvetten der Analysegeräte pipettiert und mit einem Detergenz versetzt. Anschließend wird photometrisch die Extinktionsänderung der Probe bestimmt. Auf dieser Basis kann proportional die entsprechende Konzentration des Parameters errechnet werden. Im Folgenden werden die homogenen Testprinzipien näher beschrieben.

### 2.3.1 Bestimmung von Gesamtcholesterin

- „CHOL“ Test (Hitachi 917 analyser, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim - Germany) <sup>(66)</sup>
- „CHOL“ Test (Synchron LX20 analyser, Beckman Coulter, Fullerton – Californien) <sup>(7)</sup>

Bei beiden Tests werden durch die CHOD-PAP-Methode (CHOD-PAP (Cholesteroxidase - Phenol4 Aminoantipyrene Peroxidase) Cholesterinester hydrolytisch unter Einwirkung von Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren (FS) gespalten. Cholesterin reagiert durch Cholesterinoxidase unter Sauerstoffverbrauch zu  $\Delta 4$ -Cholestenon (=Cholest-4-en-3-on) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Letzteres bildet mit 4-Aminoantipyrin (4-AAP) und Phenol unter katalytischer Einwirkung der Peroxidase einen Farbstoff (Trinder-Reaktion<sup>(86)</sup>). Die Extinktionsänderung des entstandenen roten Chinonimins kann photometrisch gemessen werden und ist proportional zur Cholesterinkonzentration.





In der Cholesterin-Referenzmethode <sup>(1, 18, 51)</sup> wird das Serum mit alkoholischer Ätzkali-Lösung behandelt, um das Cholesterin aus den Lipoproteinkomplexen herauszulösen und die Cholesterinester zu verseifen. Mit Wasser verdünnt wird Cholesterin in eine definierte Menge von Petroleumether extrahiert. Die Messung wird in einer Teilprobe der Petroleumether-Schicht mit der Liebermann-Burchard-Reaktion durchgeführt.

Die Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (RiliBÄK) <sup>(17)</sup> und das Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN) <sup>(56)</sup> der Centers for Disease Control and Prevention (CDC) aus Atlanta geben hier klare Grenzen für Ungenauigkeit der Messung vor (Tabelle 3).

Referenzmethode Gesamtcholesterin	CRMLN <sup>(56)</sup>	RiliBÄK <sup>(17)</sup>
Liebermann-Burchard <sup>(18, 51)</sup> modifiziert nach Abell-Kendall <sup>(1)</sup>	Max. Abweichung: ≤ 8,9%  Unpräzision: ≤ 3%  Unrichtigkeit: ≤ 3%	Zulässige relative Abweichung des Einzelwertes bzw. des relativen quadratischen Mittelwertes 7%  Zulässige relative Abweichung beim Ringversuch 13%

**Tabelle 3:** Qualitätsanforderungen nach CRMLN <sup>(56)</sup> und RiliBÄK <sup>(17)</sup> für Gesamtcholesterin

Folgende Störfaktoren sind laut Herstellerangaben bereits bekannt:

	„CHOL“ Test <sup>(66)</sup> Hitachi 917	„CHOL“ Test <sup>(7)</sup> Synchron LX20
Hämoglobin (Hämolyse)	bis 700 mg/dl des Hb kein signifikanter Effekt	bis 500 mg/dl des Hb kein signifikanter Effekt
Bilirubin	bis 25 mg/dl konjug. Bilirubin kein signifikanter Effekt	bis 30 mg/dl des Bilirubins ≤ -25 mg/dl Cholesterin
Lipämie	bis 1250 mg/dl kein signifikanter Effekt	bis 400 mg/dl kein signifikanter Effekt
	kein signifikanter Effekt bedeutet ± 10% vom Ausgangswert	kein signifikanter Effekt bedeutet ± 6% oder 10mg/dl

**Tabelle 4:** Mögliche Interferenzfaktoren des automatisierten CHOL Tests

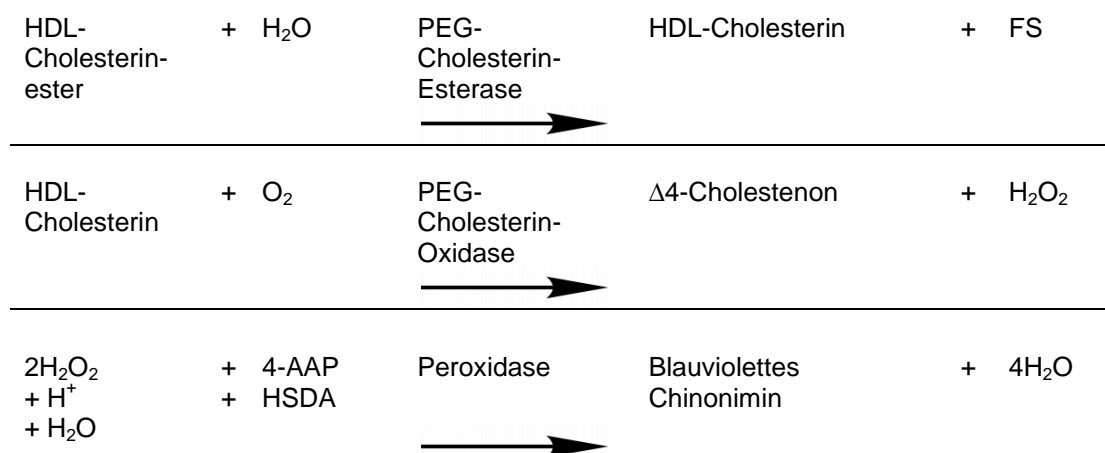
### 2.3.2 Bestimmung von HDL-Cholesterin

- „HDL-C“ Test (Hitachi 917 analyser, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim - Germany) <sup>(67)</sup>

Reagenz 1 erreicht durch Komplexbildung von Dextransulfat und den Apo-B-haltigen LDL, VLDL und Chylomikronen in Gegenwart von  $Mg^{++}$  eine höhere Stabilität gegenüber Polyethylenglycol (PEG)-modifizierten Enzymen. In Reagenz 2 befinden sich die modifizierte Cholesterinesterase und Cholesterinoxidase, welche durch Aminogruppen an PEG-Enzyme gebunden sind. Sie reagieren bevorzugt mit HDL-Partikeln.

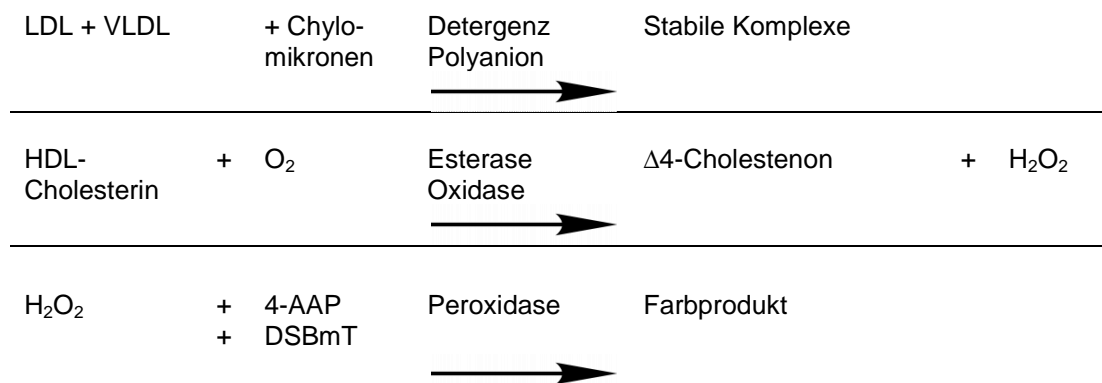
Es entsteht neben  $\Delta 4$ -Cholestenon auch Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Dieses wird mit 4-AAP und Natrium N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilin (HSDA) durch die Peroxidase zu einem blauviolettten Farbstoff umgesetzt.

Dessen photometrisch gemessene Intensität ist proportional zur HDL-Cholesterinkonzentration.



- „HDL-D“ Test (Synchron LX20 analyser, Beckman Coulter, Fullerton – Californien) <sup>(8)</sup>

Ein Polyanion bewirkt die Komplexbildung von LDL, VLDL und Chylomikron-Lipoproteinen, sodass HDL-Cholesterin alleine weiter umgesetzt wird.  $H_2O_2$  reagiert mit 4-Aminoantipyrin und N,N-bis(4-sulphobutyl)-m-toluidin-dinatrium (DSBmT) durch die Peroxidase zu einem Farbstoff, dessen Extinktionsänderung proportional zur HDL-Cholesterinkonzentration ist.



Die HDL-Cholesterin-Referenzmethode <sup>(57)</sup> beschreibt eine Präzipitation im Rahmen der Ultrazentrifugation. Eine kostengünstigere und schnellere Methode ist die Designated Comparison Method (DCM) <sup>(42)</sup>, bei der durch Dextransulfat alle Lipoproteine außer HDL-Cholesterin ausfallen. HDL wird im Überstand durch die Abell-Kendall Cholesterin Referenzmethode gemessen. Die (RiliBÄK)<sup>(17)</sup> und das (CRMLN)<sup>(57)</sup> geben hier klare Grenzen für Ungenauigkeit der Messung vor (Tabelle 5).

Referenzmethode HDL-Cholesterin	CRMLN <sup>(57)</sup>	RiliBÄK <sup>(17)</sup>
Ultrazentrifugation mit Präzipitation (s. LDL), Abell-Kendall <sup>(1, 57)</sup> ; DCM <sup>(42)</sup>	Abweichung: ≤ 5%, maximal tolerierbar bei Einzelmessung 13% Unpräzision: ≥ 42mg/dl ≤ 4% < 42mg/dl ≤ 1,7%	Laut Herstellerangaben: Roche: < 5% <sup>(67)</sup> Beckman: 3,0 - 4,5% Abweichung <sup>(8)</sup>

**Tabelle 5:** Qualitätsanforderungen nach CRMLN<sup>(57)</sup> und RiliBÄK<sup>(17)</sup> für HDL-Cholesterin

Folgende Störfaktoren sind laut Herstellerangaben bereits bekannt:

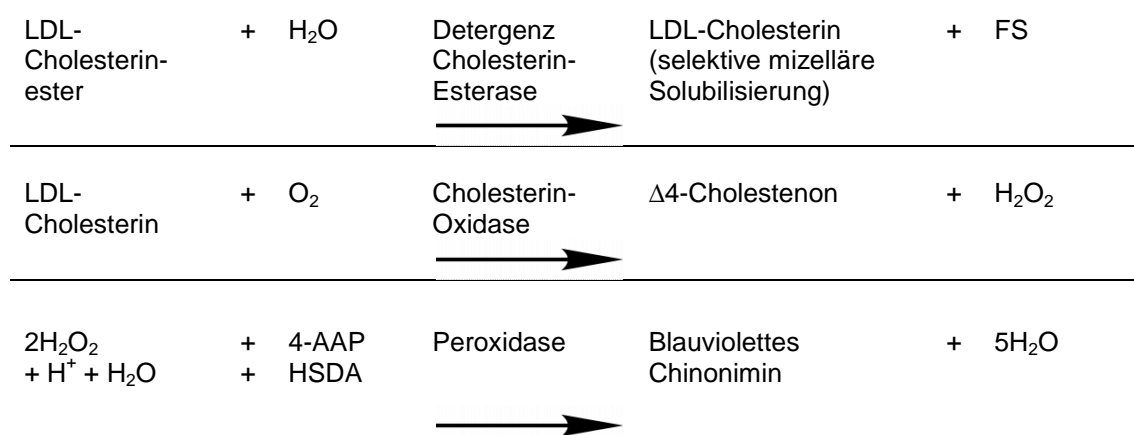
	„HDL“ Test <sup>(67)</sup> Hitachi 917	„HDL“ Test <sup>(8)</sup> Synchron LX20
Hämoglobin (Hämolyse)	bis 1200 mg/dl des Hb kein signifikanter Effekt	bis 500 mg/dl des Hb kein signifikanter Effekt
Bilirubin	bis 60 mg/dl konjug. Bilirubin kein signifikanter Effekt	bis 30 mg/dl des Bilirubins kein signifikanter Effekt
Lipämie	bis 1200 mg/dl Triglyceride kein signifikanter Effekt	bis Triglyceride ≤ 1700 mg/dl kein signifikanter Effekt
	kein signifikanter Effekt bedeutet ± 10% vom Ausgangswert Abweichungen bei Leberfunktionsstörungen möglich	kein signifikanter Effekt bedeutet ± 6% oder 6 mg/dl

**Tabelle 6:** Mögliche Interferenzfaktoren des automatisierten HDL Tests

### 2.3.3 Bestimmung von LDL-Cholesterin

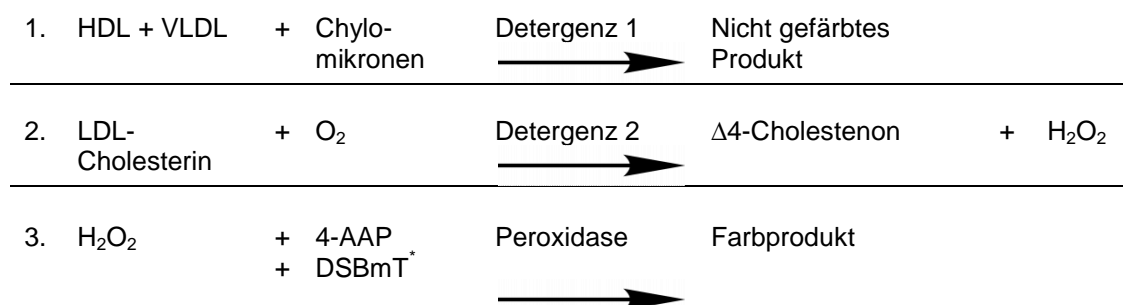
- „LDL-C“ Test (Hitachi 917 analyser, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim - Germany) <sup>(68)</sup>

Eine selektive mizelläre Solubilisierung (= Erhöhung der Löslichkeit) von LDL-Cholesterin durch ein nichtionisches Detergenz vergrößert die Reaktivität der LDL-Partikel mit den Enzymen. Die enzymatische Reaktivität von VLDL und Chylomikronen wird dagegen verringert, sodass LDL-Cholesterin selektiv umgesetzt wird. Nach Reaktion mit 4-AAP + HSDA wird der entstandene Farbstoff photometrisch gemessen



- „LDLD“ Test (Synchron LX20 analyser, Beckman Coulter, Fullerton - Californien) <sup>(9)</sup>

Das Detergenz 1 löst ausschließlich Nicht-LDL-Partikel und induziert die Reaktion mit Cholesterinesterase und -oxidase; es entsteht ein farbloser Komplex. Das Detergenz 2 löst Cholesterin der verbliebenen LDL Partikel und ermöglicht die enzymatische Umsetzung in Anwesenheit von 4-AAP und DSBmT. Die Extinktionsänderung wird bei 560nm gemessen.



In der LDL-Cholesterin Referenzmethode<sup>(58)</sup> findet zunächst bei einer Dichte von 1,006g/ml während der Ultrazentrifugation eine Separierung der VLDL und Chylomikronen statt. HDL und LDL wandern in den Unterstand mit höherer Dichte. Der Cholesteringehalt dieser Fraktionen wird bestimmt. Es folgt die Präzipitation durch ein Heparin-Mangan-haltiges Reagenz. LDL wird von der HDL-Fraktion getrennt und fällt aus.

Der Cholesteringehalt der verbleibenden HDL-Fraktion im Überstand wird bestimmt. Durch Subtraktion des HDL-C von (LDL-C + HDL-C) ergibt sich der LDL-Cholesterin Gehalt des Präzipitates. Der Cholesteringehalt der Fraktionen wird von einem durch das CDC standardisierten enzymatischen Test nach der Abell-Kendall Referenzmethode<sup>(1)</sup> gemessen. Die (RiliBÄK)<sup>(17)</sup> und das (CRMLN)<sup>(58)</sup> geben hier klare Grenzen für Ungenauigkeit der Messung vor (Tabelle 7).

Referenzmethode LDL-Cholesterin	CRMLN <sup>(58)</sup>	RiliBÄK <sup>(17)</sup>
β-Quantifikation <sup>(34, 64)</sup>	Max. Abweichung: ≤ 12%  Unpräzision: ≤ 4%  Unrichtigkeit: ≤ 4%	Laut Herstellerangaben:  Roche: wie CRMLN <sup>(68)</sup>  Beckman: 2,0 - 3,0% Abweichung <sup>(9)</sup>

**Tabelle 7:** Qualitätsanforderungen nach CRMLN<sup>(58)</sup> und RiliBÄK<sup>(17)</sup> für LDL-Cholesterin

Folgende Störfaktoren sind laut Herstellerangaben bereits bekannt:

	„LDL“ Test <sup>(68)</sup> Hitachi 917	„LDLD“ Test <sup>(9)</sup> Synchron LX20
Hämoglobin (Hämolyse)	bis 1500 mg/dl des Hb kein signifikanter Effekt	bis 400 mg/dl des Hb kein signifikanter Effekt
Bilirubin	bis 35 mg/dl konjug. Bilirubin kein signifikanter Effekt	bis 24 mg/dl des Bilirubins kein signifikanter Effekt
Lipämie	bis 1200 mg/dl Triglyceride kein signifikanter Effekt	bis Triglyceride ≤ 800 mg/dl kein signifikanter Effekt
	kein signifikanter Effekt bedeutet ± 10% vom Ausgangswert Abweichungen bei Leberfunktionsstörungen möglich	kein signifikanter Effekt bedeutet ± 5% oder 5 mg/dl

**Tabelle 8:** Mögliche Interferenzfaktoren des automatisierten LDL Tests

## 2.4 Sequentielle Ultrazentrifugation

Das Prinzip, Lipoproteine des Blutplasmas durch sequentielle Ultrazentrifugation nach ihrer Dichte voneinander zu separieren, beschrieben zuerst John Gofman<sup>(29)</sup> und De Lalla<sup>(20)</sup> in den 50 er Jahren. Der Ablauf ist in Abbildung 2 dargestellt. Die sequentielle Ultrazentrifugation wird zusammen mit der chemischen Präzipitation Apo-B-haltiger Lipoproteine ‚ $\beta$ -Quantifikation‘ (BQ)<sup>(64)</sup> genannt. Diese wurde durch die National Institutes of Health (NIH) und die U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) für die LDL-Messung als Goldstandard festgelegt<sup>(34)</sup>. Nach dem Prinzip der BQ von Dr. Richard Havel<sup>(37)</sup> und Kollegen wird nach dem Abzentrifugieren von Chylomikronen und VLDL-Cholesterin das Cholesterin der verbleibenden LDL-IDL-, Lp(a)- und HDL-Fraktionen bestimmt. Die Differenz zum Gesamtcholesterin ergibt somit die VLDL. Anschließend werden die LDL-Partikel gefällt, sodass das HDL-Cholesterin gemessen werden kann. Die Differenz der Cholesterinwerte vor und nach der Präzipitation ergibt den LDL-Cholesterinanteil. Allerdings sind darin auch die IDL- und Lp(a) Partikel enthalten. In unserer Studie wurden daher alle Fraktionen durch Ultrazentrifugation ohne Präzipitation schrittweise isoliert, sodass die realen Werte der Lipoproteinanteile für einen Vergleich mit den homogenen Methoden zugrunde gelegt wurden.

Der ausstehende Vergleich zwischen automatisiertem und sequentiellem Verfahren war nur bei ausreichender Mindestprobenmenge (2ml) möglich. Zunächst erfolgte nach dem Auftauen der ausgewählten 83 Heparin-Plasma-Proben mit unerklärbarem Lipoproteinprofil die erneute enzymatische Bestimmung. Die Ultrazentrifugation und Bestimmung von VLDL, IDL, LDL und HDL lief folgendermaßen ab: Unterschiedliche Kaliumbromid(KBr)-Stammlösungen ließen die leichten Lipoproteinpartikel im Schwerfeld der Ultrazentrifuge in den Überstand flottieren, sodass sie anschließend enzymatisch gemessen werden konnten. Das Cholesterin dieser Lipoproteinfraktion wurde dann unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors errechnet. Der Unterstand mit den übrigen Lipoproteinen wurde durch eine vorgeschriebene Dichtelösung weiter auf den nächsten Dichtebereich angehoben (siehe Tabelle 9). Verwendet wurden ein bei 4°C vorgekühlter fixer Angelmotor (Typ 50.4 Ti, Beckman Coulter, Fullerton, USA),

Probengefäße (Polyallomer Slice Tubes ‚Quickseal no 344619‘, Beckman Coulter) und adäquate Verplomber und Schneider („Tube Slicer“). Die Rotationsgeschwindigkeit der Zentrifuge betrug 49.000RPM (rounds per minute, 300.000 x g), 18 Stunden lang für VLDL, 18 Stunden für IDL, 24 Stunden für LDL und 48 Stunden für HDL. Abbildung 2 und Tabelle 9 zeigen den Ablauf einer sequentiellen Dichteultrazentrifugation, der im Folgenden näher beschrieben wird:

*Schritt 1:* 2ml Probenmaterial und 4ml 0,9%ige Natriumchlorid (NaCl)-Lösung wurden mittels Spritzenadel in Quickseal Zentrifugenröhrchen transferiert. Es ergab sich in Schritt 1 eine Trennungsdichte von  $<1,006\text{g/ml}$ . Nach dem Zuschweißen mit Metallkappen (Quickseal Tube Sealer) wurden die Röhrchen in den Rotor der Ultrazentrifuge eingebracht. Leere Plätze wurden mit Röhrchen gleicher Lösungsdichte bestückt und anschließend nach Schema zentrifugiert.

*Schritt 2 -> VLDL:* Nach der Zentrifugation wurden die Quickseal Röhrchen vorsichtig aus dem Rotor entnommen und mit einer speziellen Messervorrichtung geschnitten. Die nun im Quickseal-Überstand befindliche Flüssigkeit mit VLDL wurde in ein Sarstedt Röhrchen überführt. War noch ein Bodensatz im Tube ersichtlich, so wurde dieser mit der Lösung des Vortages (0,9%ige NaCl Lösung) gelöst und dann auf ein Ausgangsvolumen von 6ml gebracht. Die entsprechende VLDL-Cholesterinfraktion wurde enzymatisch gemessen und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors errechnet.

Der Unterstand wurde mit der Dichtelösung des Vortages auf ein Volumen von 5ml ergänzt, mit einer  $1,35\text{ g/ml}$ -Dichte KBr-Salzlösung ( $188,6\ \mu\text{l}$ ) versetzt (=Dichte  $1,019\text{ g/ml}$  für IDL) und mit einer entsprechenden  $1,019\text{ g/ml}$ -Dichtelösung auf 6ml ergänzt. Diese Lösung wurde luftblasenfrei in Quickseal Röhrchen überführt. Das weitere Procedere wurde analog zu Schritt 1 durchgeführt.

*Schritt 3 -> IDL:* Behandlung des Überstandes: Analog zu Schritt 2.

Der Unterstand wurde mit einer  $1,019\text{ g/ml}$ -KBr-Dichtelösung auf 5ml ergänzt und mit  $740,8\ \mu\text{l}$  Stammlösung auf eine Dichte von  $1,063\text{ g/ml}$  (für LDL)

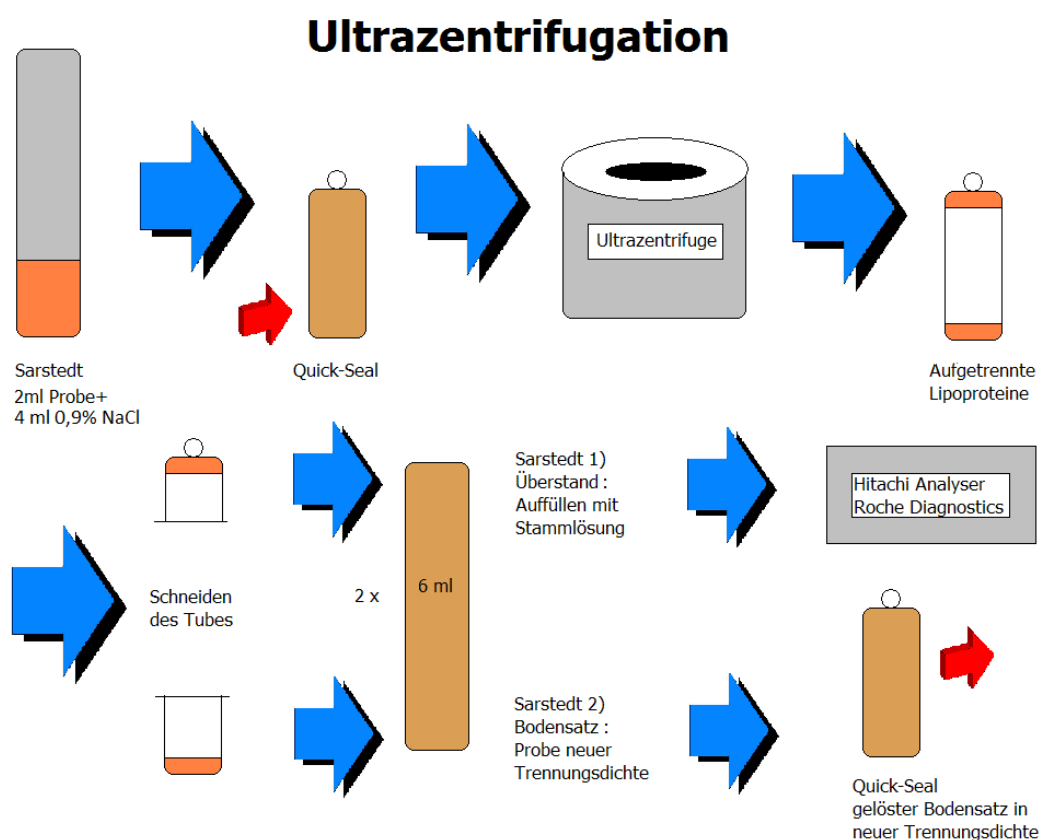
eingestellt und mit einer 1,063 g/ml-KBr-Dichtelösung auf ein Volumen von 6ml vervollständigt. Wie zuvor erfolgt die Zentrifugation nach Schema.

*Schritt 4 -> LDL:* Behandlung des Überstandes: Analog zu Schritt 2 und 3.

In der untersten Schicht fanden sich die Lipoproteine mit einem hohen Dichtegrad (HDL). Nun musste erst 1,178g KBr in Sarstedt-Röhrchen eingewogen werden, bevor der Unterstand dazu gegeben und gemischt werden konnte. Mit einer 1,063g/ml-KBr-Dichtelösung wurde auf 5ml ergänzt, sodass sich eine Dichte von 1,21g/ml ergab. Eine 1,21 g/ml-KBr-Stammlösung komplettierte dann das Probenvolumen von 6ml.

*Schritt 5 -> HDL:* Behandlung des Überstandes: Analog zu Schritt 2 - 4.

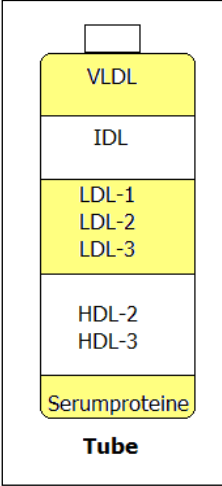
Der Unterstand wurde verworfen.



**Abbildung 2:** Durchführung der Ultrazentrifugation



	Dichte [g/ml]	je 2ml Probe +....	Dauer
<b>VLDL</b>	<1,006	+ 4ml 0,9% NaCl-Lsg. = 6ml	18h
<b>IDL</b>	1,006 - 1,019	Unterstand + 1,006g/ml = 5ml + 188,6 µl KBr-Lsg.(1,35g/ml) + 1,019g/ml-Lsg. bis 6ml	18h
<b>LDL</b>	1,019 - 1,063	Unterstand + 1,019g/ml = 5ml + 740,8µl KBr-Lsg.(1,35g/ml) + 1,063g/ml-Lsg. bis 6ml	24 Std
<b>HDL</b>	1,063 - 1,21	Unterstand + 1,063g/ml = 5ml + 1,178g KBr einwiegen + 1,063g/ml-Lsg. (bis 5ml) + 1,21g/ml-Lsg. bis 6ml	48 Std
<b>Proteine</b>	> 1,21		



**Tabelle 9:** Schematische Darstellung einzelner Ultrazentrifugationsschritte

## 2.5 Methodenvergleich

Es wurden 173 venös entnommene Heparinplasmaproben, darunter 108 mit implausiblem Cholesterinprofil und 65 mit normalem Cholesterinprofil als Restmaterial gesammelt und anonymisiert asserviert. Es fanden nach dem Auftauen Vergleichsmessungen mit den automatisierten Tests von Roche und Beckman Coulter statt (Kap.2.3). Somit konnte eine gleiche Ausgangsbasis geschaffen und das Risiko einer zeit- oder aggregatbedingten Probenveränderung ausgeschlossen werden. Proben mit zu geringem Volumen für beide Methoden wurden bereits vor dem Auftauen ausgeschlossen.

Als Ergebnis dieser Arbeit wurden die Werte von Gesamtcholesterin, HDL, LDL, Triglyceride und Bilirubin verglichen und graphisch dargestellt.

## 2.6 Bestimmung von Triglyceriden

Mit der Glycerinphosphatoxidase-Phenol 4-Aminoantipyrine Peroxidase (GPO-PAP) Methode lassen sich die Triglyceridkonzentrationen (Hitachi 917 analyser, Roche Diagnostics, Mannheim) bestimmen. Während des enzymatischen Farbtests hydrolysiert zunächst die Lipoproteinlipase Triglyceride zu Glycerin und freien Fettsäuren. Durch die Anwesenheit von

ATP und Glycerokinase entsteht Glycerin-3-phosphat, welches anschließend durch Glycerinphosphatoxidase (GPO) zu Dihydroxyacetonphosphat und  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgesetzt wird. Letzteres reagiert mit Chlorphenol und 4-Aminoantipyrine zu einem Farbstoff, dessen Intensität photometrisch gemessen wird und proportional zur Triglyceridkonzentration ist<sup>(78)</sup>.

## 2.7 Bestimmung von Bilirubin

Die vorliegende Bestimmung von Gesamtbilirubin entspricht der von Wahlefeld et al.<sup>(89)</sup> entwickelten Methode, bei der zur Reaktionsbeschleunigung und zur Vermeidung von Proteinpräzipitaten 2,5-Dichlorphenyldiazonium-tetrafluorborat (DPD) eingesetzt wird. Indirektes Bilirubin wird freigesetzt. Im sauren Milieu reagiert das Gesamtbilirubin anschließend mit DPD zu einem Azobilirubin. Die Farbintensität dieses Produktes kann photometrisch gemessen werden.

## 2.8 Bestimmung und Aufstocken von Gallensäuren

Die Plasmakonzentration von Gallensäuren wurde in 30 Proben mit den beschriebenen Anomalien bestimmt. Die Messung wurde in Kooperation mit einem externen Labor (Bioscientia Labor Ingelheim) durchgeführt. Im enzymatischen Farbtest (TRINITY Biotech GmbH, Darmstadt) setzt  $3\alpha$ -Hydroxysteroid-dehydrogenase ( $3\alpha$ -HSD=Nitrotetrazolium-Blau) die  $3\alpha$ -Hydroxy-Gallensalze in Gegenwart von NAD (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid) zu 3-oxo-Gallensäuren um. Das dabei reduzierte NADH reagiert mit dem Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) zu einem blauen Formazan-Derivat. Die Extinktion wird bei 530 nm gemessen. Die Methode geht auf das Verfahren von Mashige<sup>(54)</sup> (1981) zurück.

Weiterhin wurden Desoxycholsäure, Cholsäure und Chenodesoxycholsäure (TRINITY Biotech GmbH, Darmstadt) in Konzentrationen von 25, 50, 100 und 200  $\mu\text{mol/L}$  zu einem Plasmapool mit normalem Lipoproteinprofil gegeben. Gesamtcholesterin, HDL und LDL und wurden nach einer 24- und 72-stündigen Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  enzymatisch gemessen.

Die Unpräzision der Tests, bemessen an dem Variationskoeffizient (VK) von Tag zu Tag, war 4-17% (7-48 $\mu\text{mol/L}$ ).

## 2.9 Bestimmung der Lipoprotein-X Konzentration

In Zusammenarbeit mit einem externen Labor wurde Lipoprotein-X physikochemisch nach der Methode nach Talafant und Továrek <sup>(83)</sup> in 30 Proben mit den beschriebenen Anomalien gemessen.

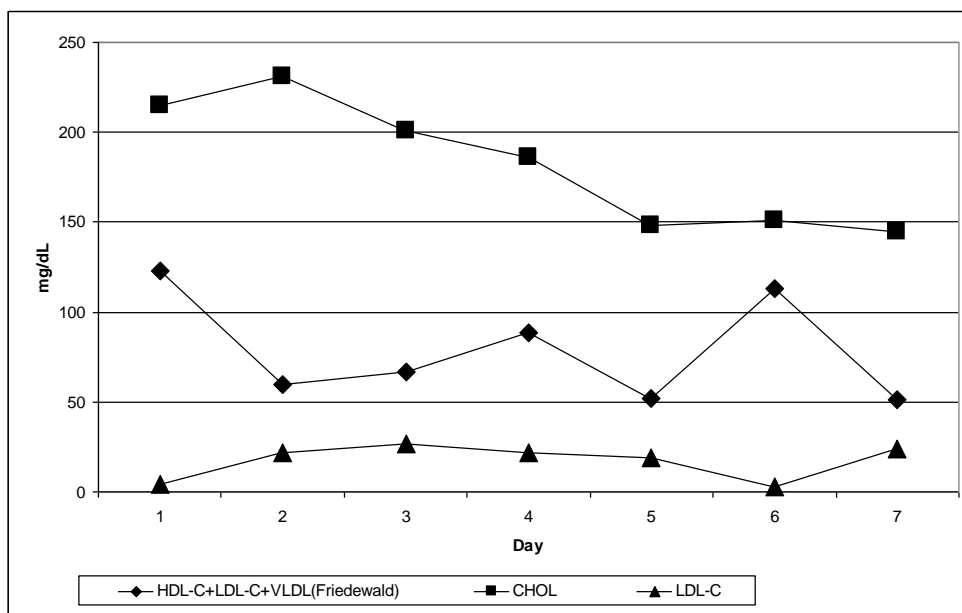
Nach Verdünnung mit einer NaCl/Heparin-Lösung wurde Lp-X von den übrigen Lipoproteinen des Serums durch eine Zinkacetat-Präzipitation unter einstündiger Inkubation bei 40°C getrennt. Der Cholesteringehalt des Überstandes wurde anschließend gemessen und der Lp-X Gehalt berechnet.

## Ergebnisse

### 3.1 Verlaufsbeobachtung

Exemplarisch wird Reproduzierbarkeit der Lipoproteindifferenz in der täglichen Verlaufskontrolle mit dem LDL-C Assay (Roche) anhand eines Beispielpatienten in Abbildung 3 gezeigt. In Folge einer metastatischen Obstruktion des Ductus hepaticus wurde in der Laborprobe Gesamtbilirubin von 0,15 mmol/L, Gallensalze von 149  $\mu\text{mol/l}$  und Lp-X von 51,04 mg/dl bestimmt.

Die Lipoproteindifferenz (Abbildung 3) zwischen errechnetem Gesamtcholesterin und gemessenem Gesamtcholesterin wird deutlich. LDL-Cholesterin ist in dem Zusammenhang stark erniedrigt.



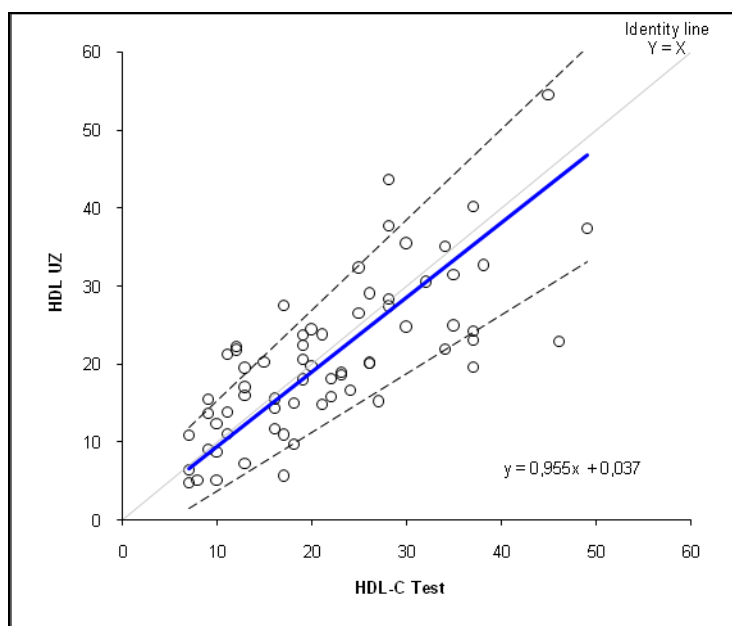
**Abbildung 3:** Reproduzierbarkeit der Lipoproteindifferenz in der täglichen LDL-Verlaufskontrolle bei einem Patienten mit metastatischer Obstruktion des Ductus hepaticus. Gesamtbilirubin 0,15 mmol/L, Gallensalze 149  $\mu\text{mol/l}$ , LpX 51,04 mg/dl

### 3.2 Vergleich von homogenem Test und Ultrazentrifugation

Es wurden 83 auffällige Serumproben mittels homogenem Test (X) und dem Referenzverfahren der Ultrazentrifugation (Y) untersucht und verglichen. Dabei wurden die Proben nach auffälligem Lipoproteinprofil zunächst anonymisiert und bei  $-30^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Heparinplasma Proben erneut homogenisiert. Danach fand die mehrtägige Prozedur der Ultrazentrifugation statt.

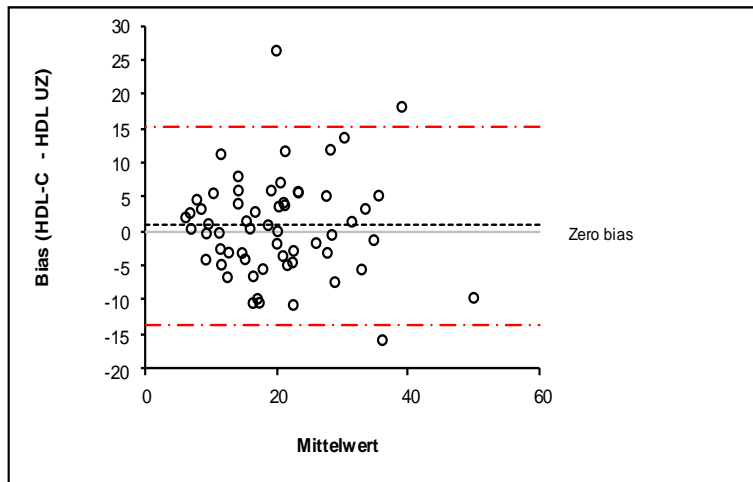
Im Folgenden werden die Ergebnisse der automatisierten Testverfahren in Korrelation zu den Ergebnissen der Ultrazentrifugation dargestellt.

Für den HDL-Cholesterin-Test (Roche) korrelierten die Messergebnisse beider Verfahren in der Auswertung nach Passing <sup>(61)</sup> und Bablok <sup>(5)</sup> sehr gut miteinander (Abbildung 4: Steigung 0,955, Achsenabschnitt 0,0376).



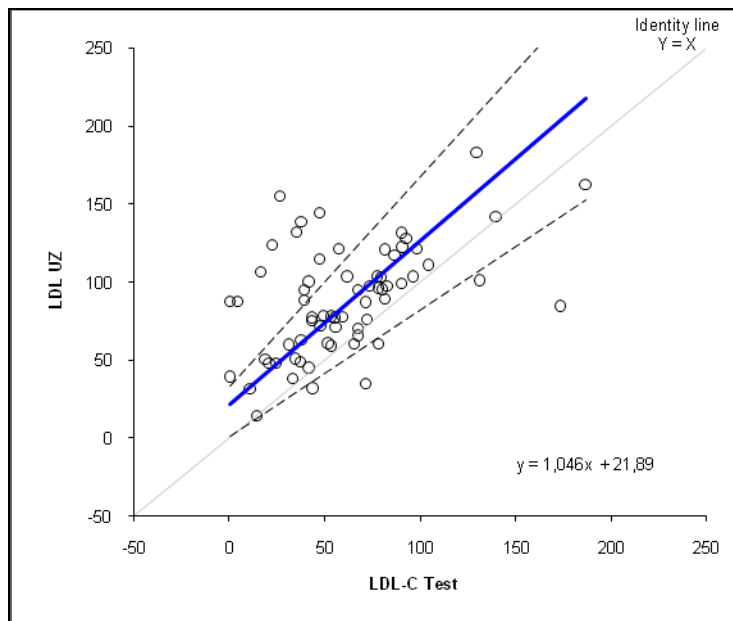
**Abbildung 4:** Methodenvergleich: HDL Ultrazentrifugation (UZ) und HDL-C-Test Roche [mg/dl]: Steigung 0,955, Achsenabschnitt 0,0376 nach Passing <sup>(61)</sup> und Bablok <sup>(5)</sup>

Nach der Auswertung mit der Bland-Altman <sup>(13, 14)</sup> Methode besteht eine geringe systemische Abweichung (= ‚Bias‘) von 0,839 mg/dl zwischen HDL-C Test (Roche) und Ultrazentrifugation (Abbildung 5).



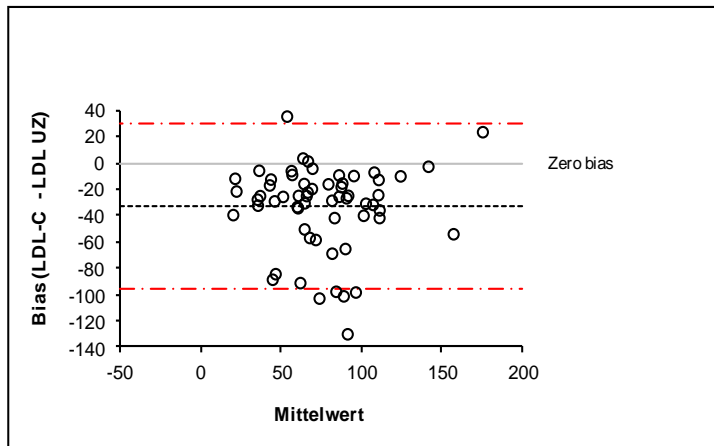
**Abbildung 5:** Methodenvergleich: HDL Ultrazentrifugation (UZ) und HDL-C Test: Median Bias 0.839 mg/dl, 95% CI -1.066 bis 2.744 mg/dl nach Bland und Altman <sup>(13, 14)</sup>

Die Ergebnisse für den LDL-Cholesterin Test von Roche im Vergleich zur Ultrazentrifugation weichen hingegen stark voneinander ab (Abbildung 6: Steigung 1,046, Achsenabschnitt 21,899).



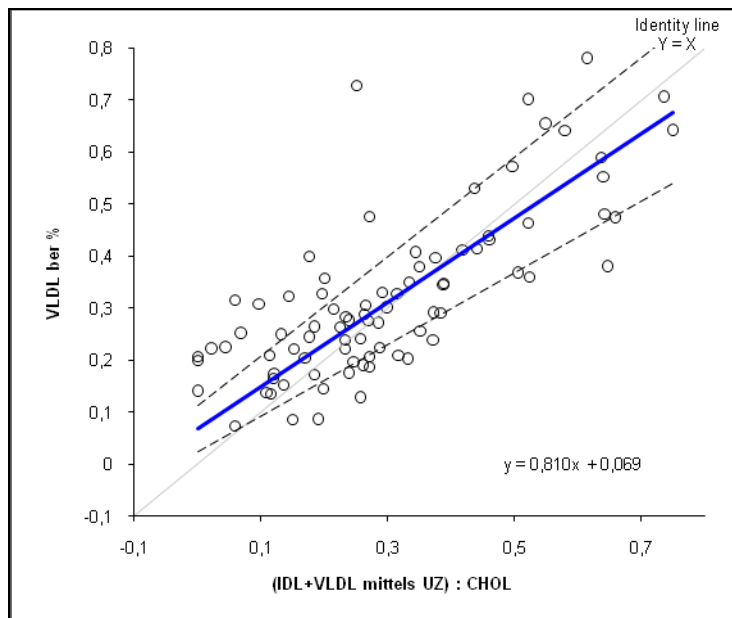
**Abbildung 6:** Methodenvergleich: LDL Ultrazentrifugation (UZ) und LDL-C Test Roche [mg/dl]: Steigung 1,046, Achsenabschnitt 21,899 nach Passing <sup>(61)</sup> und Bablok <sup>(5)</sup>

Der Bias zwischen LDL-C Test und Ultrazentrifugation ist mit -33.040 mg/dl deutlich größer als derjenige für den HDL-C Test und Ultrazentrifugation mit 0,839 mg/dl (Abbildung 7).



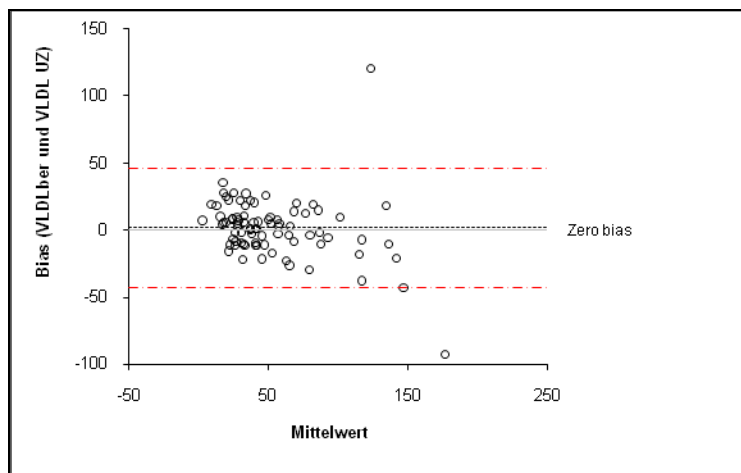
**Abbildung 7:** Methodenvergleich: LDL Ultrazentrifugation (UZ) und LDL- Test Roche: Median Bias -33,040 mg/dl, 95% CI -41,355 bis -24,725 mg/dl nach Bland und Altman (13, 14)

Die errechneten Werte für VLDL-Cholesterin im Vergleich zu den gemessenen Werten mittels Ultrazentrifugation ergaben keine größeren Differenzen (Abbildung 8: Steigung 0,811, Achsenabschnitt 0,069).



**Abbildung 8:** Methodenvergleich: Berechnetes VLDL [%] und IDL+VLDL/ CHOL mittels Ultrazentrifugation (UZ): Steigung 0,811, Achsenabschnitt 0,069 nach Passing (61) und Bablok (5)

Es besteht zwischen berechnetem und gemessenem VLDL ein geringer Bias von 1.911 mg/dl (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Methodenvergleich: Berechnetes VLDL[%] und IDL+VLDL mittels Ultrazentrifugation (UZ) [mg/dl]: Median Bias 1,911 mg/dl, 95% CI -3,072 bis 6,893 mg/dl nach Bland und Altman <sup>(13, 14)</sup>

Der prozentuale Unterschied zwischen der Ultrazentrifugation und den homogenen Tests nach der Methode von Bland-Altman war für den LDL-C-Test signifikant höher als für den HDL-C-Test ( $p < 0.0001$ ). Somit kann von einer eindeutigen Störung des LDL-C Tests (Fa. Roche) ausgegangen werden. Das LDL-Cholesterin wird im homogenen Test nach Roche somit unterschätzt, wie anhand der Abbildungen 6 und 7 deutlich gezeigt wird.

Die VLDL-Werte waren im Vergleich zur Referenzmethode unauffällig und erklären nicht die bestehende Lipoproteinlücke.

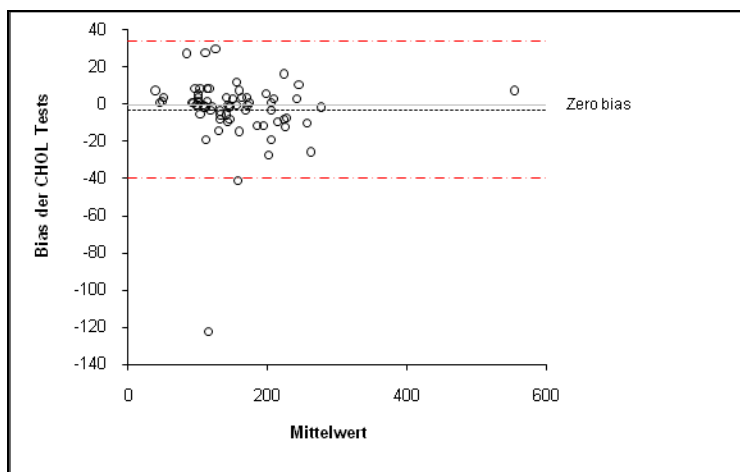


### 3.3 Vergleich der homogenen Assays Roche & Beckman

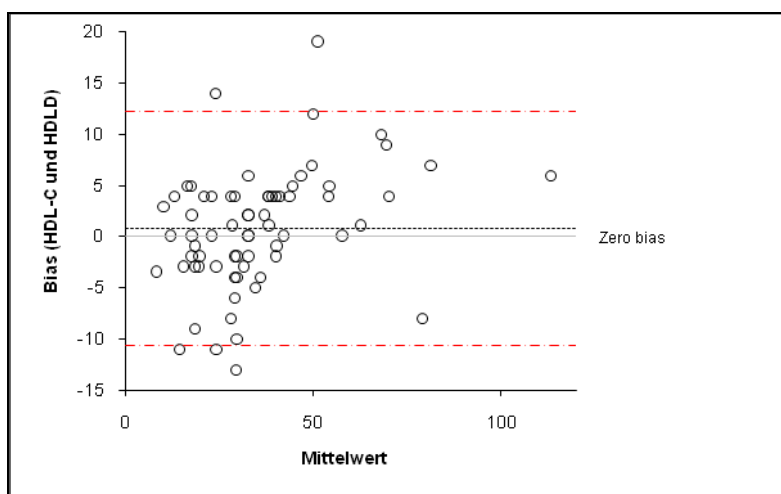
Es wurden 173 Proben gesammelt, davon wurden 65 Proben mit unauffälligem und 108 mit auffälligem Lipoproteinprofil mit den beschriebenen automatisierten Tests (Kap. 2.3) untersucht.

#### 3.3.1 Proben mit unauffälligem Lipoproteinprofil

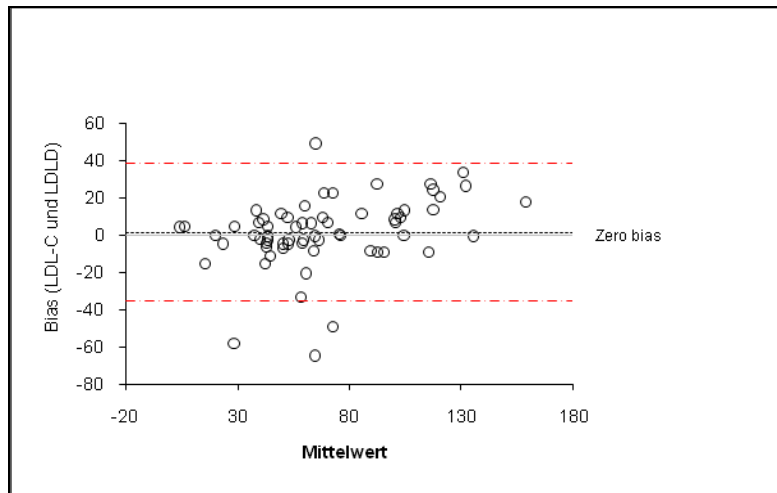
In den 65 Proben mit plausiblen Lipoproteinprofil ergaben sich gute Korrelationen der Gesamtcholesterin-, HDL- und LDL- Tests. Der Median Bias lag für Gesamtcholesterin bei -2,706 mg/dl (Abbildung 10), für HDL bei 0,831 mg/dl (Abbildung 11) und für LDL bei 1,626 mg/dl (Abbildung 12).



**Abbildung 10:** Methodenvergleich CHOL (Roche) – CHOL (Beckman): Median Bias -2.706 mg/dl, 95% CI -7,215 bis 1,803 mg/dl nach Bland und Altman <sup>(13, 14)</sup>



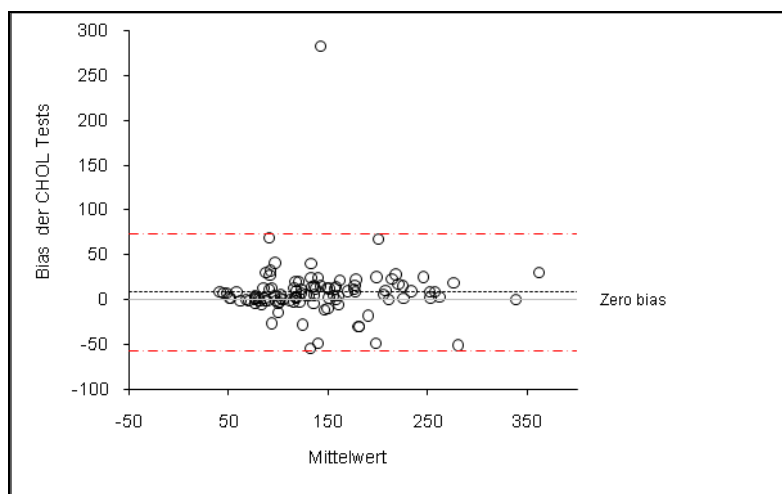
**Abbildung 11:** Methodenvergleich HDL-C (Roche) – HDLD (Beckman): Median Bias 0,831 mg/dl, 95% CI -0,584 bis 2,246 mg/dl nach Bland und Altman <sup>(13, 14)</sup>



**Abbildung 12:** Methodenvergleich LDL-C (Roche) – LDLD (Beckman): Median Bias 1,626 mg/dl, 95% CI -3,045 bis 6,297 mg/dl nach Bland und Altman<sup>(13, 14)</sup>

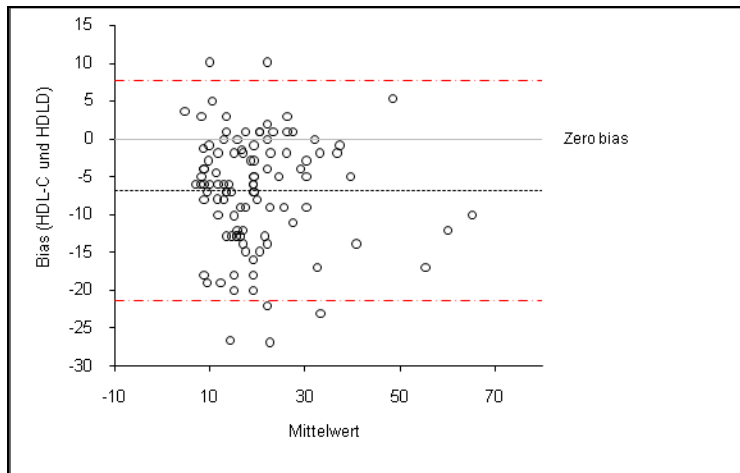
### 3.3.2 Proben mit auffälligem Lipoproteinprofil

In den 108 Proben mit auffälligem Lipoproteinprofil zeigte der Vergleich der Gesamtcholesterin-Tests beider Hersteller eine geringe Differenz von 8,152 mg/dl (Abbildung 13: Median Bias 8,152 mg/dl, 95% CI 1,727 bis 14,577).



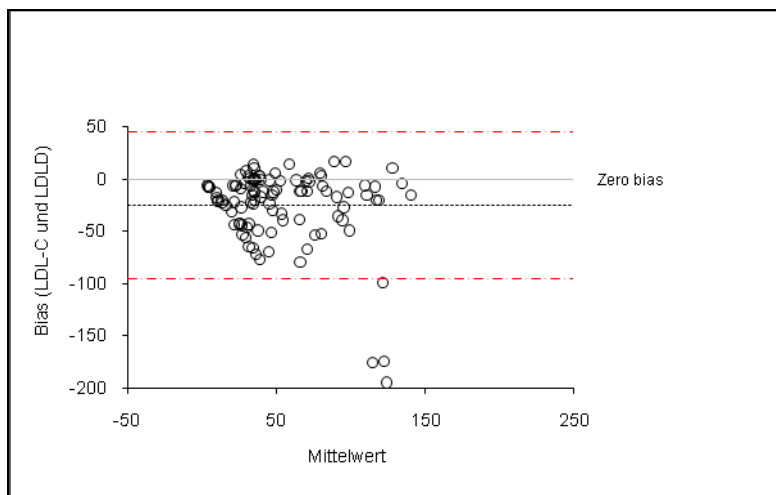
**Abbildung 13:** Methodenvergleich auffällige Proben CHOL (Roche) – CHOL (Beckman): Median Bias 8,152 mg/dl, 95% CI 1,727 bis 14,577 mg/dl nach Bland und Altman<sup>(13, 14)</sup>

Die homogenen HDL Tests von Roche und Beckman stimmten ebenfalls gut überein (Abbildung 14: Median Bias -6,904 mg/dl, 95% CI -8,347 bis 5,461).



**Abbildung 14:** Methodenvergleich auffällige Proben HDL-C (Roche) – HDLD (Beckman): Median Bias -6,904 mg/dl, 95% CI -8,347 bis 5,461 mg/dl nach Bland und Altman<sup>(13, 14)</sup>

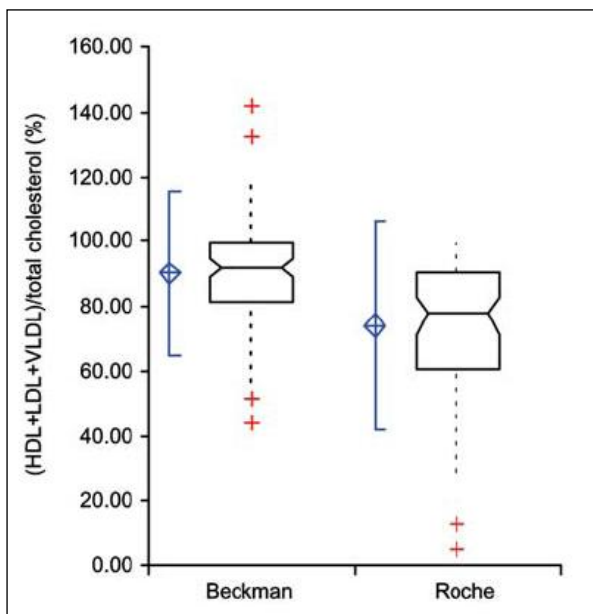
Im Vergleich des LDL-C Tests mit dem LDLD-Test (Fa. Beckman) zu einem negativen Bias von -24.452 mg/dl (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Methodenvergleich auffällige Proben LDL-C (Roche) – LDLD (Beckman): Median Bias -24,452 mg/dl, 95% CI -31,400 bis 17,505 mg/dl nach Bland und Altman<sup>(13, 14)</sup>

In manchen Messungen des LDL-C Tests wurde eine beachtliche Lücke bis zu 95% zwischen der Summe der Lipoproteinfraktionen und dem Gesamtcholesterin festgestellt, nicht jedoch bei dem LDLD-Reagenz.

Der Box-Whisker-Plot zeigt in diesem Zusammenhang das Verhältnis aller addierten Lipoproteinfraktionen zum Gesamtcholesterin. Es ist eine größere Streuung und asymmetrische Verteilung der Roche-Messungen im Vergleich zu Beckman zu erkennen (Abbildung 16).



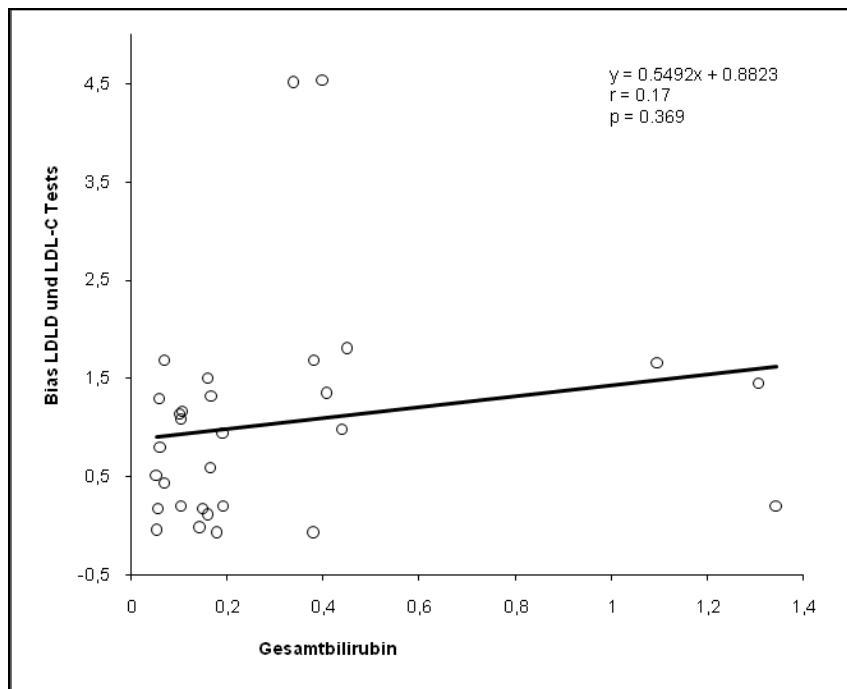
- ++ : Ausreißer
- Box: enthält 50% der Daten
- Median: je 25% der Boxdaten liegen ober- und unterhalb
- - - größter und kleinster Datenwert

**Abbildung 16:** Reagenzienvergleich: Der Box-Whisker-Plot zeigt in den Proben mit auffälligem Lipoproteinprofil das Verhältnis der prozentualen Summe aller Lipoproteinfraktionen zum Gesamtcholesterin

Die analytische Leistung der Tests war sehr gut. Die Unpräzision für HDLD war 1.09-2.45 %, für HDL-C 2.87 %, für LDLD 1.83-2.01 % und für LDL-C 0.58-1.69 %.

### 3.4 Effekt von Bilirubin

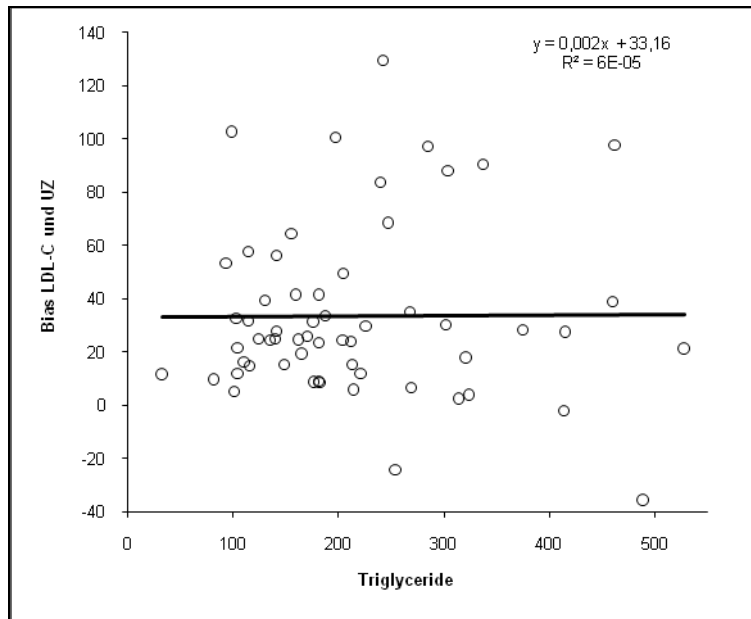
In Proben mit implausiblen Lipoproteinprofilen wurde Gesamtbilirubin bestimmt. Es zeigte sich eine schwache Korrelation des Bilirubins (mmol/l) zu dem Bias zwischen LDL-C Test und LDLD Test (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Korrelation zwischen Gesamtbilirubin (mmol/l) und Bias der LDL Tests LDL – LDL-C [mg/dl]:  $R = 0,17$ , 95% CI -0,20 bis 0,50 nach Passing<sup>(61)</sup> und Bablok<sup>(5)</sup>

### 3.5 Effekt von Triglyceriden

In diesen Proben bestanden keine Assoziationen zwischen dem LDL-C Bias und der Triglyceridkonzentration (Abbildung 18:  $R = 0,01$ , 95% CI -0,25 bis 0,26,  $p = 0,95$ ). Der HDL-C Test blieb ebenfalls unbeeinflusst von Gesamtbilirubin- oder Triglyceridkonzentration ( $R = 0,03$ ;  $p = 0,738$ ).

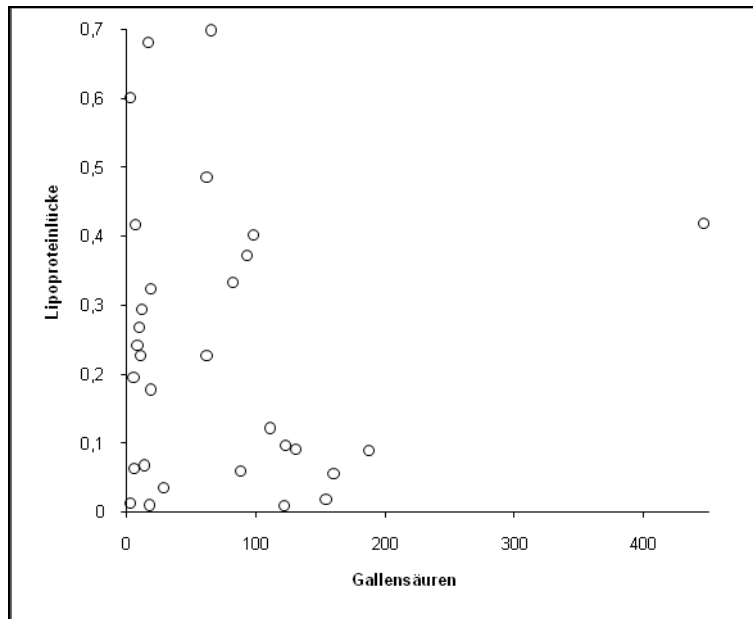


**Abbildung 18:** Keine Korrelation zwischen Triglyceriden [mg/dl] und Bias des LDL-C Tests mit der Ultrazentrifugation [mg/dl]:  $R = 0,01$ , 95% CI -0,25 bis 0,26,  $p = 0,95$  nach Passing<sup>(61)</sup> und Bablok<sup>(5)</sup>

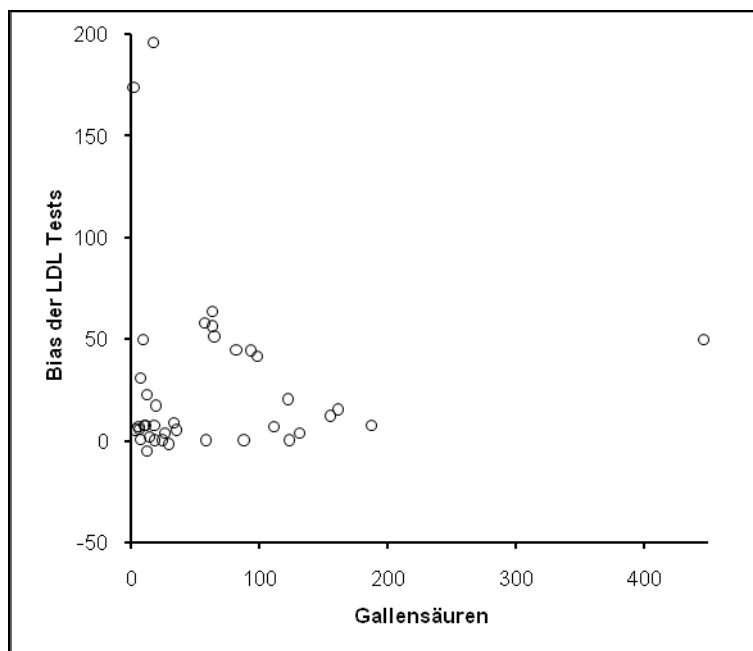
### 3.6 Effekt der Gallensäuren

Die Konzentration der Gallensäuren in 30 gesammelten Patientenproben betrug zwischen 2,7 und 446  $\mu\text{mol/l}$  (Mediane Konzentration 46  $\mu\text{mol/l}$ , 95% CI 4,5-175  $\mu\text{mol/l}$ ).

Die absolute Konzentration der Gallensäuren korrelierte weder mit der Lipoproteinlücke (Abbildung 19:  $R = -0,15$ , 95% CI -0,48 bis 0,22), noch mit dem LDL-Bias der Roche und Beckman Tests (Abbildung 20:  $R = 0,09$ , 95% CI -0,24 bis 0,40)



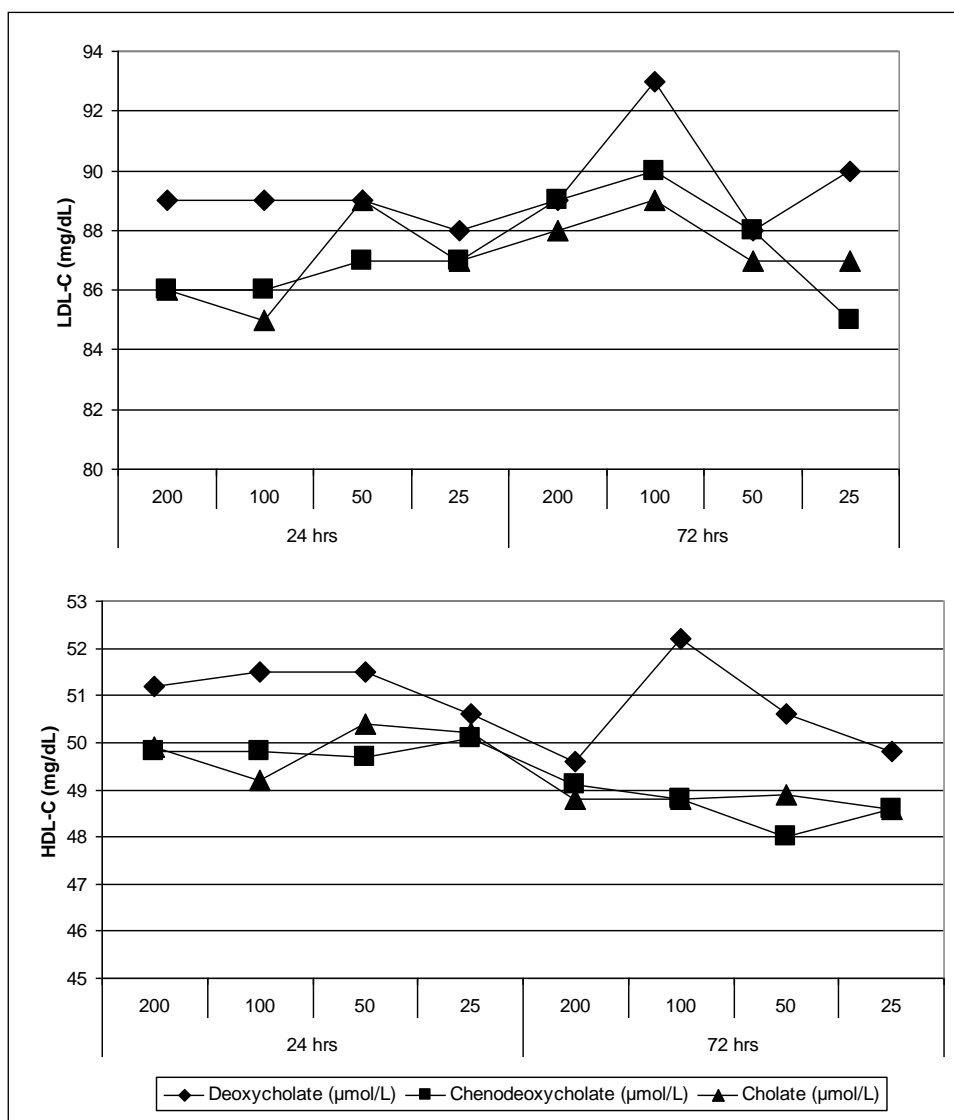
**Abbildung 19:** Keine Korrelation zwischen Gallensäuren [ $\mu\text{mol/l}$ ] und der Lipoproteinlücke [mg/dl] (gemessen mit Hitachi 917, Roche Diagnostics):  $R = -0,15$ , 95% CI - 0,48 bis 0,22



**Abbildung 20:** Keine Korrelation zwischen Gallensäuren [ $\mu\text{mol/l}$ ] und Bias der LDL Tests [mg/dl]  $R = 0,09$ , 95% CI -0,24 bis 0,40

Auch die zugesetzten Gallensalze hatten keinen Effekt auf die LDL und HDL Tests beider Herstellersysteme, weder im Hinblick auf Höhe der Konzentration, noch auf Dauer der Inkubation.

In Abbildung 21 ist eine mögliche Veränderung der LDL-C Konzentration [mg/dl] in Abhängigkeit von der zugesetzten Gallensalzkonzentration [ $\mu\text{mol/l}$ ] und der Zeit (24 und 72h) dargestellt. Diese sowie auch die HDL-C Konzentration im unteren Diagramm zeigen keine Veränderung.



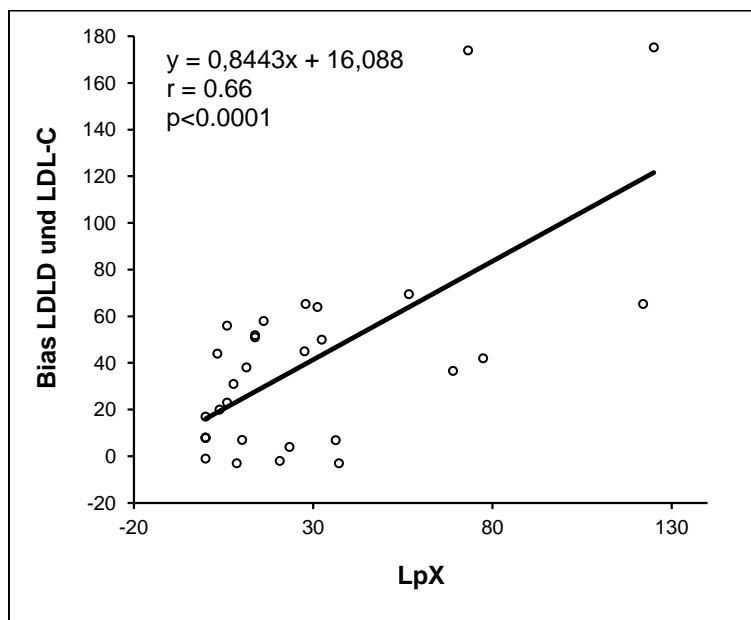
**Abbildung 21:** Kein Effekt der zugesetzten Gallensalze [ $\mu\text{mol/l}$ ] mit unterschiedlicher Einwirkdauer und -konzentration auf die LDL und HDL Tests [mg/dl]



### 3.7 Effekt von Lipoprotein-X

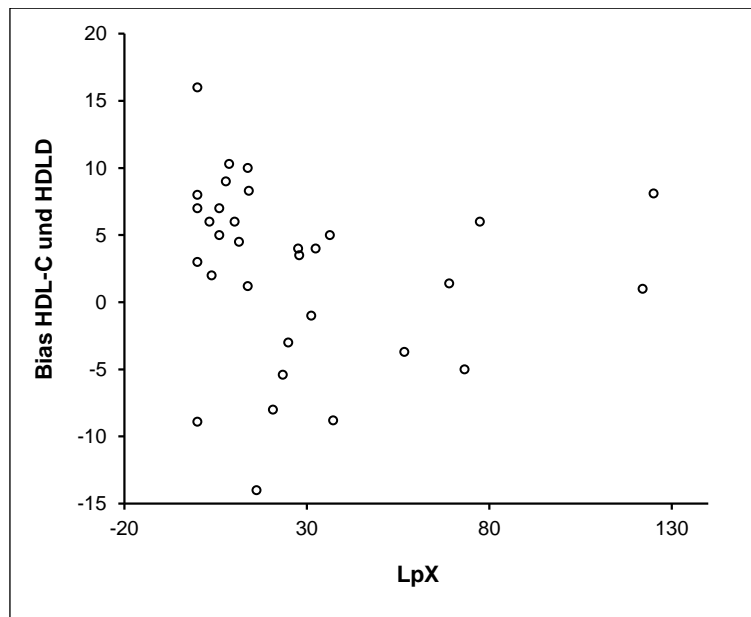
Der Normalwert für Lipoprotein-X liegt unter 10 mg/dl (entspricht 0,3 mmol/l nach SI Einheit). In den 30 untersuchten Patientenproben mit auffälligem Lipoproteinprofil ergaben sich erhöhte Serum-Lipoprotein-X-Konzentrationen zwischen 0 und 124,9 mg/dl (Median 15,46 mg/dl, 95. Perzentile 0–97,44 mg/dl).

Es konnte eine eindeutige positive Korrelation zwischen der Lp-X Konzentration und dem Bias zwischen homogenem LDLD und LDL-C Test nachgewiesen werden (Abbildung 22:  $R = 0,66$ , 95% CI 0,39 bis 0,82,  $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 22:** Korrelation zwischen LP-X [mg/dl] und Bias der LDL Tests LDLD – LDL-C [mg/dl]:  $R = 0,66$ , 95% CI 0,39 bis 0,82,  $p < 0,0001$

Ein solcher Zusammenhang ließ sich nicht zwischen der Lp-X Konzentration und den Ergebnissen der HDL-Tests feststellen (Abbildung 23:  $R = -0,13$ , 95% CI -0,46 bis 0,23,  $p = 0,483$ ).



**Abbildung 23:** Korrelation zwischen LP-X [mg/dl] und Bias der HDL Tests [mg/dl]:  $R = -0,13$ , 95% CI -0,46 bis 0,23,  $p = 483$

In Proben mit sehr hohen Lp-X Konzentrationen konnte eine LDL-C Interferenz mit auffällig niedrigen Konzentrationen von LDL <10 mg/dl festgestellt werden. Der LDLD Test hingegen blieb unbeeinflusst.

Werden die gemessenen Werte für Lp-X Cholesterin zu den Cholesterinfraktionen von HDL, LDL und VLDL addiert, so reduziert sich die durchschnittliche Lipoproteinlücke von 39,83 mg/dl auf 11,60 mg/dl. Im Vergleich dieser Summen mit den jeweiligen Werten des Gesamtcholesterins, ergibt sich dennoch in 11 von 30 Proben eine bestehende Lipoproteindifferenz von >25 %.

Die Unpräzision der Tests, bemessen an dem Variationskoeffizient (VK) von Tag zu Tag, war 3,4 - 6,15% (25-49 mg/dl).

## Diskussion

Eine genaue Cholesterindifferenzierung ist sowohl für die Risikoeinschätzung von Atherosklerose mit all ihren Folgeerkrankungen als auch für die Therapieeinstellung von großer Bedeutung. Auch Studien, welche die Zusammenhänge von Cholesterinkonzentration, Lipoproteinverteilung und Pathophysiologie erforschen, sind auf eine genaue Analytik angewiesen.

In der täglichen automatisierten Routinemessung der Fettstoffwechselfparameter wurden wiederholt im akkreditierten Laboratorium der Universität Marburg in manchen Serumproben implausibel niedrige LDL-Konzentrationen gemessen. Es bestanden unerklärliche Differenzen bis zu 160 mg/dl zwischen der Summe der automatisiert bestimmten Cholesterinfraktionen und dem Gesamtcholesterin. Hauptsächlich waren Proben von Patienten mit gestörter Leberfunktion betroffen.

### 4.1 Historie und Gegenwart der Lipoproteinanalytik

- Gesamtcholesterin:

Der Historie zufolge konnte 1885/1889 erstmalig unverestertes und freies Cholesterin nach Liebermann-Burchard <sup>(18, 51)</sup> quantifiziert werden. Methodisch wird Cholesterin aus den zu untersuchenden Materialien durch Chloroform oder Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von Essigsäureanhydrid bzw. Schwefelsäure entstehen blau-grüne Kondensationsprodukte aus den Steroidgrundkörpern. Die entstandenen Polyene (organische Kohlenstoffverbindungen) bzw. deren Carbeniumionen können bei 560-580 nm photometrisch gemessen werden. Die Extraktion ist jedoch relativ unspezifisch. Die Bestimmung nach Abell und Kendall (1952) <sup>(1)</sup> ist dagegen spezifisch, aber aufwendig und teuer. Sie wird in Kombination mit der Liebermann-Burchard-Reaktion als Referenzmethode für die Gesamtcholesterinbestimmung des Cholesterol Reference Method Laboratory Network <sup>(56)</sup> eingesetzt. Mit diesen Verfahren werden alle anderen Methoden verglichen und zertifiziert.

Seit 1974 ist es nach Roeschlau und Allain <sup>(2, 65)</sup> möglich, vollenzymatisch Gesamtcholesterin zu messen. Es folgt zunächst die Spaltung der

Cholesterinester mittels Cholesterinesterase, dann die Umwandlung durch Cholesterinoxidase und zuletzt die photometrische Messung des entstandenen Wasserstoffperoxids ( $H_2O_2$ ) nach der ‚Trinder-Reaktion‘ (1969)<sup>(86)</sup>. Dies bildet die Grundlage der modernen Cholesterinmessung mit Analyseautomaten und homogenen Assays.

- HDL-Cholesterin:

HDL-Cholesterin kann nach Fällung der übrigen Lipoproteine mit Phosphorwolframsäure/  $MgCl_2$ , Heparin/  $MnCl_2$  oder Polyethylenglycol 6000 quantifiziert werden.

Stark erhöhte Triglyceride können eine unvollständige Fällung hervorrufen und das HDL Ergebnis verfälschen. Deshalb sollten diese Proben vorher ultrazentrifugiert werden<sup>(50)</sup>. Die 1999 entwickelte Designated Comparison Method (DCM) verwendet Dextransulfat/  $MgCl_2$ <sup>(42, 90)</sup> zur Fällung und ist damit eine schnellere, alternative Referenzmethode im Vergleich zur Ultrazentrifugation<sup>(57)</sup> (Kapitel 2.3.2). Nach Fällung oder Abzentrifugation der übrigen Lipoproteine wird das HDL-Cholesterin enzymatisch bestimmt.

- LDL-Cholesterin:

Lange Zeit war es in der Routinediagnostik hingegen nicht möglich LDL-Cholesterin direkt zu bestimmen. Mit Hilfe der Friedewald Formel (1972)<sup>(26)</sup> lässt sich ein approximativer LDL-Wert indirekt errechnen, wenn die Messwerte von Cholesterin, HDL und Triglyceriden vorliegen.

$$\text{Cholesterin}_{\text{gesamt}} = \text{LDL}_{\text{Cholesterin}} + \text{HDL}_{\text{Cholesterin}} + \text{VLDL}$$

lässt sich umformen zu:

$$\text{LDL}_{\text{Cholesterin}} = \text{Cholesterin}_{\text{gesamt}} - \text{HDL}_{\text{Cholesterin}} - \text{VLDL}$$

VLDL Partikel enthalten den größten Anteil der frei zirkulierenden Triglyceride. Ihre Zusammensetzung ist relativ konstant, somit errechnet sich der VLDL-Wert aus den Triglyceriden dividiert durch fünf<sup>(35)</sup>.

Die Blutabnahme darf nur im nüchternen Zustand erfolgen. Ansonsten können sich bei der Berechnung für LDL falsch niedrige Werte durch Chylomikronen, erhöhte Triglyceride (>400 mg/dl), Hyperlipoproteinämie (HLP) und sekundäre

Lipidstoffwechselstörungen wie Diabetes mellitus ergeben. Verlor die Friedewald-Formel ihre Gültigkeit, so konnte LDL-Cholesterin nur mit viel laboratoriellem und zeitlichem Aufwand durch die sequentielle Ultrazentrifugation isoliert werden.

Die Cholesterinwerte von IDL- und Lp(a) fließen aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften wie LDL bei Anwendung der Friedewaldformel oder auch bei der Beta-Quantifikation in die LDL-Cholesterinbestimmung ein. Daher wurde in dieser Studie zur genauen Differenzierung der einzelnen Lipoproteinklassen die sequentielle Ultrazentrifugation angewendet (siehe Kap. 2.4).

Eine indirekte und ungenaue Methode der LDL-C-Bestimmung ist eine Fällung durch Polymere<sup>(79)</sup>. Nach Inkubation wird zentrifugiert und der Fällungsüberstand gewonnen. Dieser enthält alle Lipoproteine außer LDL. Die Cholesterin-Differenz vor und nach der Fällung entspricht der LDL-Cholesterin-Konzentration<sup>(64)</sup>.

Eine weitere Möglichkeit der Lipoproteinbestimmung stellt die Elektrophorese dar. Je nach Ladung und Wanderungsverhalten auf unterschiedlichen Medien können die einzelnen Klassen durch Anfärben voneinander getrennt, dabei jedoch auch nur ungenau quantifiziert werden. Daher kamen für diese Arbeit jene Methoden nicht zur Anwendung.

Mittlerweile sind homogene automatisierte Tests für LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin in deutschen Labors weit verbreitet und genießen große Akzeptanz aufgrund ihrer schnellen und präzisen analytischen Arbeitsvorgänge<sup>(38, 59, 60, 62, 77)</sup>. Es bestehen bei dieser direkten Bestimmung keine Einschränkungen wie Nüchternblutabnahme oder Stoffwechseleränderungen<sup>(68)</sup>, die eine Verwendung der Friedewaldformel für die LDL-Berechnung einschränken<sup>(35)</sup>. Die Ansprüche an derartige homogene Tests sind hoch: Sie sollen robust und zugleich sensitiv sein. Innerhalb kürzester Zeit müssen im Alltag der Laborroutine damit viele verschiedene Parameter unabhängig von Stoffwechselprozessen bestimmt werden. Vorbehandlungen sind im Allgemeinen nicht notwendig und ein kleines Probenvolumen reicht zur Bestimmung der Laborwerte aus. Die Zertifizierung erfolgt gemäß der NCEP Richtlinien<sup>(56, 57, 58)</sup>.

## 4.2 Homogene automatisierte Tests

In der vorliegenden Studie wurden mögliche Störfaktoren auf die Cholesterindifferenzierung während einer cholestatischen Stoffwechselsituation sowohl durch zwei unterschiedliche Analyser als auch durch die sequentielle Ultrazentrifugation untersucht.

Beide Tests der automatisierten Cholesterinmessung beruhen hierbei auf der CHOD-PAP Methode, die Cholesterinesterase und  $\alpha$ -oxidase sowie Peroxidase nutzen, um anschließend photometrisch den Gehalt der Cholesterinkonzentration bestimmen zu können.

Die Tests für die HDL-Cholesterinmessung nutzen zum einen die Komplexbildung durch Dextransulfat in Verbindung mit Polyethylenglycol-modifizierten Enzymen (Roche), zum anderen die Komplexbildung durch Polyanione (Beckman). Am Ende der jeweiligen Reaktionen entspricht die Extinktionsänderung des Produktes proportional dem Cholesteringehalt der HDL Partikel.

Die LDL Tests waren in dieser Arbeit von besonderem Interesse. In dem von Roche entwickelten Verfahren vergrößert ein nichtionisches Detergenz die Reaktivität der LDL-Partikel mit Enzymen, das zweite Detergenz verringert die Reaktivität von VLDL und Chylomikronen. LDL-Cholesterin wird dadurch selektiv umgesetzt und der entstandene Farbstoff photometrisch gemessen.

Bei dem Verfahren von Beckman Coulter werden durch Detergenz 1 ausschließlich Nicht-LDL-Partikel gelöst und nach einigen Zwischenreaktionen entsteht ein farbloser Komplex. Das Detergenz 2 löst Cholesterin der verbliebenen LDL Partikel und misst nach deren weiteren enzymatischen Umsetzung die Extinktionsänderung, welche proportional dem Cholesteringehalt der LDL Partikel entspricht.

Mittels sequentieller Ultrazentrifugation können alle Lipoproteinklassen voneinander je nach Dichtegrad getrennt und anschließend enzymatisch gemessen werden. Sie ist die Referenzmethode dieser Studie.

### 4.3 Interferenzen in der Cholesterindifferenzierung

In der Entwicklung und Optimierung solcher Reagenzien für Analyser finden viele serielle Versuche statt. Nur begrenzt können dort durch die Literatur beschriebene Interferenzen getestet werden. So sind fragwürdige Messergebnisse im Alltag nicht ungewöhnlich. Sie sind nicht zwingend „Ausreißer“, sondern vielleicht Resultat einer gestörten Analyse.

Gegenstand dieser Studie waren unerklärbar niedrige LDL-Werte von Patienten mit cholestatischer Stoffwechsellage, die mit einem 2. Generations-LDL-C Test gemessen wurden. Die Proben dieser Studie stammten überwiegend von Patienten mit einer beeinträchtigten Leberfunktion.

Alle Proben mit erhöhten Laborparametern, welche laut Hersteller die Testergebnisse verändern können, wurden von weiteren Messungen ausgeschlossen. Dazu gehörten auch lipämische oder hämolytische Seren, welche Mess-Interferenzen durch Trübung oder Lichtstreuung verursachen <sup>(48)</sup>. Es stellte sich nun die Aufgabe, die Laborparameter herauszufinden, welche unter cholestatischen Bedingungen erhöht waren und die homogene automatisierte LDL-Messung stören könnten.

Kennzeichnend für eine Cholestase ist die Reduktion des Galleflusses, sowie die veränderte Zusammensetzung oder Sekretion von gallengängigen Lipiden. Auch Bilirubin und Gallensäuren gelangen durch eine mechanische Obstruktion oder funktionelle Einschränkung des Galleexkretionsmechanismus in die Leber statt in die Blutzirkulation. Ein Bias der Cholesterindifferenzierung durch diese Parameter ist denkbar.

- Hypertriglyceridämie

Störungen solcher Art sind in der Literatur für Bedingungen mit atypischer Lipoproteinmetabolisierung bereits beschrieben. Die Studie von Esteban-Salan zeigte bei Vorliegen einer Hypertriglyceridämie im Vergleich zweier homogener Assays mit der Beta-Quantifikation eine Störung in der Lipoproteindifferenzierung <sup>(24)</sup>. Eine ähnliche Vorgehensweise wählten auch Usui et al <sup>(88)</sup>. Es wurde insbesondere der Einfluss auf zwei LDL-Cholesterin Assays durch small dense LDL und VLDL beschrieben.

- Gallensäuren

Gallensäuren werden aus Cholesterin in der Leber synthetisiert. Beim Verlassen des Organs wird ein großer Teil der Gallensäuren mit Coenzym A aktiviert und dann mit Aminosäuren konjugiert. Sie werden in dieser Form als Gallensalze bezeichnet und gelangen während der Verdauung mit der Galle in den Darm. Als Detergens für Nahrungsfette werden sie nach Reabsorption im Ileum erneut der Leber zugeführt. Die Gallensäure – Konzentration ist bei Virushepatitis, alkoholtoxischer Hepatitis, Leberzirrhose, PBC, Cholestase und zystischer Fibrose erhöht. Durch deren Bestimmung ist die Frühdiagnose einer Leberzellfunktion möglich. Interferenzen in der Lipoproteinanalytik wurden bisher nicht beschrieben.

- Bilirubin

Bilirubin als Abbauprodukt von gealterten Erythrozyten reagiert aufgrund einer chemischen Zwischenreaktion beim Bilirubinzerfall mit Peroxidase katalysierten Reaktionen. Diese liegen auch der Cholesterinmessung zugrunde<sup>(48)</sup>. Einen Einfluss von erhöhtem Bilirubin bei der Cholesterinmessung mit homogenen Assays belegten Glick et. al in einer Studie von 1986<sup>(28)</sup>. Laut aktuellen Herstellerangaben der Fa. Roche/Hitachi<sup>(66)</sup> und Beckmann Coulter<sup>(7)</sup> stören erhöhte Werte ab 25 mg/dl (428µmol/L) von konjugiertem und ab 10 mg/dl (171 µmol/L) von unkonjugiertem Bilirubin<sup>(66)</sup> die Differenzierung.

- Lipoprotein X

Durch die Ultrazentrifugation konnte erstmals 1967 Lipoprotein-X aus dem Serum von Patienten mit cholestatischer Stoffwechsellage herausgefiltert werden<sup>(74, 75, 76)</sup>. Physikochemisch und immunologisch unterscheidet es sich von den normalen Lipoproteinen durch seinen hohen Gehalt an Phospholipiden und freiem Cholesterin. Mit Intensität der Cholestase nimmt die Konzentration von Lp-X zu, aber auch bei Erkrankungen wie familiärem LCAT-Mangel oder anderen hepatozellulären Lebererkrankungen wurde Lp-X gefunden<sup>(21)</sup>. Als besonderes Merkmal fehlt das auf der Oberfläche gelegene Apoprotein-B – das Haupt-Apoprotein der LDL's. Es wird vermutet, dass Lp-X oder eine Vorstufe davon bereits in der Galle vorliegt und unter



pathophysiologischen Bedingungen durch transzellulären Transport in die Zirkulation übergeht<sup>(21)</sup>. Lp-X ist somit ein sehr sensitiver und spezifischer Marker für eine Cholestase, da hierbei Galleflüssigkeit mit dem Serum in Kontakt kommt<sup>(55, 91)</sup>. Studien von Fei<sup>(25)</sup> und Garcia-Hejl<sup>(27)</sup> gaben Hinweise, dass auch erhöhte Werte von Lipoprotein-X die Cholesterindifferenzierung verändern können. Iwasaki et. al zeigten 2006 ebenfalls den Einfluss von abnormalen Lipoproteinen wie Lipoprotein X auf die automatisierte homogene Cholesterindifferenzierung<sup>(39)</sup>.

Auch der Einfluss des Lp-X auf die Lp(a) Messung wurde bereits belegt. Das Lipoprotein(a) ist ein LDL-ähnliches und cholesterinreiches Lipoprotein mit Verbindung zum Apolipoprotein (a) über eine Disulfidbrücke. Je nach individueller Konzentration kann es als unabhängiger Risikofaktor für KHK gelten insbesondere bei gleichzeitiger Erhöhung des LDL-C. Hohe Konzentrationen > 30 mg/dl verdoppeln das koronare Risiko und korrelieren mit vorzeitiger Atherosklerose und Schlaganfall<sup>(69)</sup>.

In der cholestatischen Stoffwechselsituation wird bisher keine Änderung der Plasmakonzentration von Lp(a) beschrieben, somit ist ein Einfluss auf die Cholesterindifferenzierung nicht denkbar. Den Einfluss jedoch des Lp-X auf die Lp(a) Messung zeigte eine Studie von 1994. Es wurden unerklärlich hohe Lp(a) Werte nach Messung durch einen auf Polyethylenglykol beruhenden Behring-Nephelometer-Analyzer Assay festgestellt. Im Vergleich mit 2 anderen Assays wurde eine unspezifische Fällungsreaktion nachgewiesen, das Präzipitat enthielt neben Lipoprotein(a) große Mengen an Lipoprotein X<sup>(6)</sup>.

#### 4.4 Schlussfolgerung

83 Serumproben mit auffälligem Lipoproteinprofil im LDL-C Test (Hitachi 917 analyser, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim – Germany) wurden mit dem Referenzverfahren der sequentiellen Ultrazentrifugation verglichen. Die Ergebnisse des HDL-C Assay korrelierten sehr gut mit der Ultrazentrifugation (Kap. 3.2). Die Resultate für den LDL-C Test wichen jedoch stark von der Referenzmethode ab. Im Vergleich zur UZ zeigte sich eine große

durchschnittliche Differenz des LDL-C Assays von  $-33,040$  mg/dl. Bei einigen Patientenproben fiel sogar eine Differenz bis zu 95% zwischen der Summe der einzelnen Lipoproteinfraktionen (HDL, LDL, VLDL) und Gesamtcholesterin auf.

Die errechneten Werte für VLDL-Cholesterin im Vergleich zur direkten Messung mittels UZ ergaben jedoch keine größeren Differenzen.

Auch in täglichen Verlaufskontrollen des Routinelabors bestätigte sich die Störung und war reproduzierbar.

Es wurden aus der Gesamtprobenmenge 65 Proben mit unauffälligem und 108 mit auffälligem Lipoproteinprofil durch die automatisierten Testsverfahren beider Hersteller untersucht. Unsere Vergleichsmessungen der 65 Proben ergaben gute Korrelationen der Gesamtcholesterin-, HDL- und LDL- Tests.

In den 108 Proben mit auffälligem Lipoproteinprofil zeigten die Vergleiche der Gesamtcholesterin- und HDL- Tests beider Hersteller eine geringe Differenz.

In der Gegenüberstellung der LDL-Reagenzien lieferte der LDL-C Test (Fa. Roche) um  $-24,45$  mg/dl niedrigere Ergebnisse wie der LDLD-Test (Fa. Beckman). In manchen Messungen des LDL-C Tests wurde eine beachtliche Lücke von bis zu 95% zwischen der Summe der Lipoproteinfraktionen und dem Gesamtcholesterin festgestellt, nicht jedoch bei dem LDLD- Reagenz.

In 30 gesammelten auffälligen Patientenproben korrelierte die absolute Konzentration der Gallensäuren weder mit der Lipoproteinlücke, noch mit dem LDL-Bias der Roche und Beckman Tests. Zugesezte Gallensalze hatten keinen Effekt auf die Tests beider Hersteller, weder im Hinblick auf Höhe der Konzentration, noch auf Dauer der Inkubation.

In allen auffälligen Proben bestanden keine Assoziationen zwischen dem LDL-C Bias und der Triglyceridkonzentration. Der HDL-C Test wurde weder durch die Gesamtbilirubin- oder Triglyceridkonzentration beeinflusst. Es wurde jedoch ein geringer Bias des LDL-C Test durch Bilirubin gezeigt.

In 30 zufällig ausgewählten Proben mit auffälligem Lipoproteinprofil, die von einem externen Labor untersucht wurden, ergaben sich erhöhte Serum-Lipoprotein-X-Konzentrationen zwischen 0 und  $124,9$  mg/dl. Es konnte eine

eindeutige positive Korrelation zwischen der Lp-X Konzentration und dem Bias zwischen homogenem LDLD und LDL-C Test nachgewiesen werden ( $p < 0,0001$ ).

Ein Zusammenhang zwischen der Lp-X Konzentration und den Ergebnissen der HDL-Tests ließ sich nicht feststellen.

In Proben mit sehr hohen Lp-X Konzentrationen konnte eine LDL-C Interferenz mit auffällig niedrigen Konzentrationen von LDL  $< 10$  mg/dl festgestellt werden. Der LDLD Test hingegen blieb unbeeinflusst.

Eine Addition der gemessenen Lp-X-Cholesterin Werte zu den Cholesterinfraktionen von HDL, LDL und VLDL reduzierte die durchschnittliche Lipoproteinlücke von 39,83 mg/dl auf 11,60 mg/dl. Es blieb somit eine deutliche Lipoproteindifferenz bestehen, in 11 von 30 Proben sogar über 25 %. Die gestörte Messung des LDL-C Assays wurde somit nicht alleine durch ein Nichterfassen des Cholesterinanteils von Lp-X erklärt.

Diese Ergebnisse sind auch mit anderen Studien <sup>(7, 25, 27, 28, 66)</sup> vereinbar, sodass die Koexistenz von hohen Bilirubin- und Lp-X-Werten in cholestatischen Patientenproben als interferierende Faktoren angenommen werden dürfen. Der Interferenzmechanismus in der LDL-Cholesterinmessung beruht wahrscheinlich auf der besonderen Zusammensetzung des Lipoprotein-X. Möglicherweise ist die Probenreaktivität mit den Reagenzien des homogenen LDL-C Test (Fa. Roche) verringert. Die in Lp-X vorkommenden Phospholipide und das freie Cholesterin reagieren eventuell nicht so stark mit den nichtionischen Detergenzien des LDL-C Assays wie das in LDL Partikeln befindliche veresterte Cholesterin. Aber auch nach rechnerischer Addition von Lipoprotein-X zu den gemessenen Lipoproteinfraktionen war in 1/3 der Fälle eine bestehende Lipoproteinlücke der homogenen Tests von  $> 25\%$  des Gesamtcholesterins zu erkennen. Wir nehmen an, dass sich der erhöhte Lp-X-Gehalt negativ auf die selektive Mizellenlösung der Low Density Lipoproteine im Roche Tests ausgewirkt hat.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Cholesterin-Zusammensetzung in Lp-X Partikeln mit der Pathogenese der Cholestase variiert. Wieland et al <sup>(91)</sup> haben eine mediane Konzentration des Lipoprotein-X-Cholesterins von 32mg/dl

(0.828 mmol/L) in Patientenproben mit tumorösen und zirrhotischen Verschlüssen gemessen. Einen Wert von 82 mg/dl (2.123 mol/L) erreichten hingegen Proben von Patienten mit Hepatitis. Die in der Studie beobachteten unterschiedlichen Interferenzgrade könnten auch durch diese Tatsache erklärt werden.

Hier müsste in weiteren Studien eine Untersuchung zur patientenbezogenen Lipoproteinlücke und der individuellen Zusammensetzung von Lp-X in Zusammenhang mit der cholestatischen Grunderkrankung erfolgen. In diesem Zusammenhang wäre auch der genaue biochemische Interferenzmechanismus bei der homogenen automatisierten Bestimmung von Bedeutung.

	Hepatitis	mechanische Cholestase	Tumoren	Zirrhose
<i>n</i> =	16	16	19	12
Vollserum Cholesterin (mg/dl)	236	192	208	150
LP-X (mg Cholesterin/dl)	82	23	32	32
%Cholesterin auf LP-X	32,8	13	19	25
HDL-Cholesterin (mg/dl)	13	18	15	16
VLDL + LDL-Cholesterin (mg/dl)	163	152	135	96
γ-GT	169	348	324	230
Alkalische Phosphatase	415	852	600	368
SGOT	238	39	77	59
SGPT	378	43	53	53
Bilirubin	6,6	9,3	4,6	3,7

**Abbildung 24:** Variation von Lp-X in Abhängigkeit der Cholestase-Pathogenese von Wieland 1982<sup>(91)</sup>

Der LDL-C Test (Fa. Roche) wird unter cholestatischen Stoffwechselbedingungen von erhöhten Lipoprotein-X Konzentrationen gestört. Der auf anderen Verfahren beruhende LDLD Test (Fa. Beckman) hingegen bleibt nahezu unbeeinflusst. Die Kenntnis dieses möglichen Bias erlaubt eine andere Interpretation gestörter LDL-Werte aus dem LDL-C Tests unter cholestatischer Stoffwechsellage. In diesem Fall sollten die Ergebnisse im Zusammenhang mit der Anamnese, der klinischen Untersuchung und anderen diagnostischen Informationen interpretiert werden und die Bestimmung durch eine andere Methode erfolgen.

## Zusammenfassung

Automatisierte homogene Systeme stehen erst seit wenigen Jahren zur Verfügung. Mögliche Interferenzen mit den Test-Reagenzien bei bestimmten pathologischen Erkrankungen sind bislang nicht hinreichend untersucht.

In der täglichen Laborroutine des Zentrallabors des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Marburg, wurden unerklärbar niedrige LDL-Werte mit einem 2. Generations-LDL-C Test (Roche) von Patienten mit cholestatischer Stoffwechsellage gemessen. Es ergaben sich zum Teil Differenzen bis zu 160 mg/dl zwischen der Summe der Lipoproteinfraktionen und dem Gesamtcholesterin.

Durch den Zusammenhang von Cholestase und metabolischer Stoffwechselstörung wurden im Plasma Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Gesamtbilirubin, Triglyceride, Gallensäuren und atypischem Lipoprotein-X untersucht. Weiterhin wurde der Effekt von zugegebenen Gallensalzen zu Proben ohne Störung des Lipoproteinprofiles erforscht.

Die Ergebnisse der oben genannten Faktoren wurden in Relation zum Bias zwischen LDL-C Test und Ultrazentrifugation als Referenzmethode gesetzt und ein Vergleich zu einem zweiten homogenen Test eines anderen Herstellers gezogen.

In Gegenüberstellung mit einem LDLD Test (Synchron LX20 analyser, Beckman Coulter, Fullerton – Californien)<sup>(9)</sup> war der LDL-C Test (Hitachi 917 analyser, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim - Germany)<sup>(68)</sup> negativ gestört (Median-Bias -24.45 mg/dl). Im Vergleich mit der sequenziellen Dichte-Ultrazentrifugation lag der Median-Bias bei -33.04 mg/dl. Die Ergebnisse von Proben mit unauffälligem Lipoproteinprofil zeigten keinen Bias im Vergleich mit einem anderen Test oder der Ultrazentrifugation.

Es zeigte sich, dass der Bias des LDL-C Tests nicht mit Triglycerid- oder Gallensalzkonzentrationen assoziiert war. Er korrelierte jedoch schwach mit ansteigender Bilirubin- und stark mit ansteigender Lp-X-Konzentration.

Die Studie kommt zu dem Ergebnis, dass unter cholestatischen Stoffwechselbedingungen der LDL-C Test (Roche) von dem atypischen Lipoprotein-X beeinflusst werden kann. In diesem Fall sollte die Bestimmung durch andere Methoden erfolgen.

## Literaturverzeichnis

1. Abell LL, Levy BB, Brodie BB, Kendall FE. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J Biol Chem* 1952; 195:357-366.
2. Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974; 20:470-475.
3. Anonymous. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Study Group. *N. Engl J Med* 1998; 339:1349-1357.
4. Assmann G, Carmena R, Cullen P, Fruchart J.-C, Lewis B, Mancini M, Olsson A, Paoletti R, Pometta D, Tikkanen M. Coronary heart disease: Reducing the risk. The scientific background for primary and secondary prevention of coronary heart disease, 3.4.6 Drug treatment of hyperlipidaemia. International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease. In cooperation with the International Atherosclerosis Society. *Circulation* 1999; 100:1930-1938.
5. Bablok W, Passing H, Bender R, Schneider B. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison Studies in clinical chemistry, Part III. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26:783-790.
6. Beaudeau JL, Peynet J, Flourie F, Keddad K, Delattre J, Rousselet F, Legrand A. Discrepancies between lipoprotein(a) concentrations in icteric sera measured by immunonephelometry and electroimmunodiffusion. *Clin Biochem.* 1994; 27(1):7-11.
7. Beckman Coulter. Beckman Coulter Synchron® System(s). CHOL. Cholesterol. Chemistry Information Sheet A18476 AE August 2010.
8. Beckman Coulter. Beckman Coulter Synchron® System(s). HDLD. HDL Cholesterol. Chemistry Information Sheet A18502 AG August 2010.
9. Beckman Coulter. Beckman Coulter Synchron® System(s). LDLD. LDL Cholesterol. Chemistry Information Sheet A18513 AK Dezember 2010.

10. Bhakdi S, Dorweiler B, Kirchmann R, Torzewski M, Weise E, Tranum-Jensen J, Walev I und Wieland E. On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J Exp Med.* 1995; 182: 1959-1971.
11. Bhakdi S. Immunpathogenese der Atherosklerose; Die Mainzer Hypothese. *Dtsch Med Wochenschr.* 2002; 127:390-394.
12. Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M und Hemmes M. Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 2348-2354.
13. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1:307-310.
14. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 1999; 8:135-160.
15. Brown MS, Goldstein JL. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Scientific American* 1984; 251:58-66.
16. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52:223-261.
17. Bundesärztekammer. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Gültig seit April 2008. *Deutsches Ärzteblatt* 2008; Jg. 105, Vol.7:341-355 und unter Einbeziehung der Korrekturmeldungen *Deutsches Ärzteblatt* 2010; Jg. 107, S. A51-52.
18. Burchard H. Dissertation, Rostock *Chem Zbl* 1890; 1, 25.
19. Deedwania P, Barter P, Carmena R, Fruchart JC, Grundy SM, Haffner S, Kastelein JJ, LaRosa JC, Schachner H, Shepherd J, Waters DD. Reduction of low-density lipoprotein cholesterol in patients with coronary heart disease and metabolic syndrome: analysis of the Treating to New Targets study. *Lancet* 2006 Sep 9; 368(9539):919-28.
20. De Lalla OF, Gofman JW. Ultrazentrifugal analysis of lipoproteins. *Methods of biochemical analysis*, New York: Interscience Press 1954; 1:459-478.

21. Donner MG, Häussinger D. Kap. 5.3: Dyslipoproteinämien bei Lebererkrankungen. Aus: Schwandt P, Parhofer K (Hrsg.), Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. Schattauer Verlag, ISBN 3794523709, 3. Auflage. Seite 302-309.
22. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whithney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. JAMA 1998; 279:1615-1622.
23. Duncan IW, Mather A, Cooper GR. The procedure for the proposed cholesterol reference method. Clinical Chemistry Division Center for Environmental Health, Centers for Disease Control, Public Health Service, U.S. Dept. of Health and Human Services. 1982.
24. Esteban-Salan M, Guimon-Bardesi A, de La Viuda-Unzueta JM, Azcarate-Ania MN, Pascual-Usandizaga P, Amoroto-Del-Rio E. Analytical and clinical evaluation of two homogeneous assays for LDL-cholesterol in hyperlipidemic patients. Clin Chem 2000; 46:1121–1131.
25. Fei H, Maeda S, Kirii H, Fujigaki S, Maekawa N, Fujii H, Wada H, Saito K, Seishima M. Evaluation of two different homogeneous assays for LDL-cholesterol in lipoprotein-x-positive serum. Clin Chem 2000; 46:1351–1356.
26. 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.
27. Garcia-Hejl C, Vest P, Renard C, Merens-Gonthier A, Boukhira A, Thefenne-Astier H. Falsely Low LDL Cholesterol Results and Cholestasis. Clinical Chemistry 2006; 52:2125-2127.
28. Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. Clin Chem 1986; 32:470–475.
29. Gofman JW, Lindgren FT, Elliot H. Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. J Biol Chem 1949; 179:973-978.



30. Goldstein JL, Brown MS. The LDL pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1977; 46:897-930.
31. Grundy SM, Becker D, Clark LT, Cooper RS, Denke MA, Howard WJ, Hunninghake DB, Illingworth DR, Luepker RV, McBride P, McKenney JM, Pasternak RC, Stone NJ, Van Horn L. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). NIH Publication 2001; No. 01-3670.
32. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC, Stone NJ. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:720–722.
33. Gylling H, Farkkila M, Vuoristo M, Miettinen TA. Metabolism of cholesterol and low- and high-density lipoproteins in primary biliary cirrhosis: cholesterol absorption and synthesis related to lipoprotein levels and their kinetics. *Hepatology* 1995; 21: 89-95.
34. Hainline A, Karon J, Lippel K. Manual of Laboratory Operations. In: Lipid Research Clinics Program, Lipid and lipoprotein analysis, 2<sup>nd</sup> ed. US Dept of Health and Human Resources, Bethesda, MD.1982.
35. Hallbach J. Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg. Thieme Verlag ISBN 3131063424. 2006; S.196.
36. Hardoon SL, Whincup PH, Lennon LT, Wannamethee SG, Capewell S, Morris RW. How much of the recent decline in the incidence of myocardial infarction in British men can be explained by changes in cardiovascular risk factors? *Circulation* AHA 2008; 117:598-604.
37. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34:1345-1353.
38. Huang YC, Kao JT, Tsai KS. Evaluation of two homogeneous methods for measuring high-density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1997; 43:1048–1055.
39. Iwasaki Y, Matsuyama H, Nakashima N. Improved specificity of a new homogeneous assay for LDL-cholesterol in serum with abnormal lipoproteins. *Clin Chem* 2006; 52:886–888.

40. Jahn CE, Schaefer EJ, Taam LA, Hoofnagle JH, Lindgren FT, Albers JJ, Jones EA, Brewer HB Jr. Lipoprotein abnormalities in primary biliary cirrhosis. Association with hepatic lipase inhibition as well as altered cholesterol esterification. *Gastroenterology* 1985; 89:1266-1278.
41. Kamstrup PR, Tybjaerg Hansen A, Steffensen R, Nordestgaard BG. Genetically elevated lipoprotein (a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA* 2009; 301:2331-2339.
42. Kimberly MM, Leary ET, Cole TG, Waymack PP for the CRMLN. 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; 45:1803-1812.
43. Koga S, Miyata Y, Ibayashi H. Plasma lipoproteins and apoproteins in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1985; 5: 286-292.
44. Koolman J, Röhm KH. Lipoproteine, Lipid-Stoffwechsel, Gallensäuren. In: Taschenatlas der Biochemie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-759403-0. 2003. S. 217, 278, 312ff.
45. Kostner GM, Laggner P, Prexl HJ, Holasek A. Investigation of the abnormal low-density lipoproteins occurring in patients with obstructive jaundice. *Biochem J* 1976; 157:401-407.
46. Kostner GM, Scharnagl H, Kostner K, März W. Kap 1: Stoffwechsel der Lipoproteine. Aus: Schwandt P, Parhofer K (Hrsg.), *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schattauer Verlag, ISBN 3794523709. 2006. 3. Auflage. Seite 4-10.
47. Kraft HG, Utermann G. Kap. 4.4: Lipoprotein(a). Aus: Schwandt P, Parhofer K (Hrsg.), *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schattauer Verlag, ISBN 3794523709. 2006. 3. Auflage. Seite 216-220.
48. Kroll MH, Elin RJ. Interference with Clinical Laboratory Analyses. *Clin Chem* 1994; 40:1996-2005.
49. Kuhlmann U, Walb D. Nephrologie: Pathophysiologie- Klinik-Nierenersatzverfahren. Georg Thieme Verlag 2008, Kap 4;194.
50. Lackner KJ, Schmitz G, Kap 7: Labordiagnostik. Aus: Schwandt P, Parhofer K (Hrsg.), *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schattauer Verlag, ISBN 3794523709. 2006. 3. Auflage. Seite 381-392.

51. Liebermann C. Ber dtsch chem Ges 1885; 18:1803.
52. Linsel-Nitschke P, Heeren J, Aherrahrou Z, Bruse P, Gieger C, Illig T, Prokisch H, Heim K, Doering A, Peters A, Meitinger T, Wichmann H.E, Hinney A, Reinehr T, Roth C, Orthlepp J.R, Soufi M, Sattler A.M, Schaefer J, Stark K, Hengstenberg C, Schaefer A, Schreiber S, Kronenberg F, Samani N.J, Schunkert H, Erdmann J. Genetik variation at chromosome 1p13.3 affects sortilin mRNA expression, cellular LDL-uptake and serum LDL levels which translates to the risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2010; 208:183-189.
53. Manzato E, Fellin R, Baggio G, Walch S, Neubeck W, Seidel D. Formation of lipoprotein-X. It's relationship to bile compounds. *J Clin Invest* 1976; 57:1248-1260.
54. Mashige F, Tanaka N, Maki A, Kamei S, Yamanaka M. Direkt spectrophotometry of total bile acids in serum. *Clin Chem* 1981; 27:1352-1356.
55. Narayanan S. Biochemistry and clinical relevance of Lipoprotein-X. *Ann Clin Lab Sci* 1984; 14:371–374.
56. National Reference System for Cholesterol. Cholesterol Reference Method Laboratory Network. Total Cholesterol Certification Protocol for Manufacturers (Revised). Oktober 2004. Eingesehen zuletzt am 06.02.2012  
<http://www.cdc.gov/labstandards/pdf/crmln/RevisedTCprotocolOct04.pdf>
57. National Reference System for Cholesterol. Cholesterol Reference Method Laboratory Network. HDL Cholesterol Certification Protocol for Manufacturers. November 2002. Eingesehen zuletzt am 06.02.2012  
<http://www.cdc.gov/labstandards/pdf/crmln/MFRHDLNov2002final.pdf>
58. National Reference System for Cholesterol. Cholesterol Reference Method Laboratory Network. LDL Cholesterol Certification Protocol for Manufacturers Revised. June 2006. Eingesehen zuletzt am 06.02.2012  
<http://www.cdc.gov/labstandards/pdf/crmln/MFRLDLJune2006final.pdf>
59. Nauck M, Graziani MS, Bruton D, Cobbaert C, Cole TG, Lefevre F, Riesen W, Bachorik PS, Rifai N. Analytical and clinical performance of a detergent-based homogeneous LDL-cholesterol assay: a multicenter evaluation. *Clin Chem* 2000; 46:506–514.

60. Nauck M, Rifai N. Analytical performance and clinical efficacy of three routine procedures for LDL cholesterol measurement compared with the ultracentrifugation -dextran sulfate-Mg<sup>2+</sup> method. *Clin Chim Acta* 2000; 294:77-92.
61. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21(11):709-720.
62. Ragland BD, Konrad RJ, Chaffin C, Robinson CA, Hardy RW. Evaluation of a homogeneous direct LDL-cholesterol Test in diabetic patients: effect of glycemic control. *Clin Chem* 2000; 46:1848-1851.
63. Renz H. Lipide und Störungen des Lipoproteinstoffwechsels. In: Renz H. (Hrsg.), *Integrative Klinische Chemie und Laboratoriums-medicin*. Walter De Gruyter Verlag, Berlin. ISBN 3-11-017367-0. 2003. S.86ff.
64. Rifai N, Warnick GH, McNamara JR, Belcher JD, Grinstead GF, Frantz ID. Measurement of low-density-lipoprotein cholesterol in serum: a status report. *Clin Chem* 1992; 38:150-160.
65. Roeschlau P, Bernt E, Gruber W. Enzymatische Bestimmung des Gesamtcholesterins im Serum. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1974;12:226.
66. Roche Diagnostics, cobas®. CHOL, Cholesterin CHOD PAP. Informationsblatt 11943901001 V13. 2010-01.
67. Roche Diagnostics, cobas®. HDL-C plus 3rd generation, HDL-Cholesterin. Informationsblatt 04713796001 V4. 2010-06.
68. Roche Diagnostics, cobas®. LDL-C plus 2nd generation, LDL-Cholesterin. Informationsblatt 03039404001 V7. 2008-05.
69. Roche Diagnostics, cobas®. Lipoprotein (a), Tina-quant. Informationsblatt 11936000001 V9. 2010-04.
70. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1976; 295:369-377, 420-425.
71. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis- an update. *N Engl J Med* 1986, 314(8):488-500.

72. Sabesin SM, Weidman SW. abnormalities in primary biliary cirrhosis: information concerning control of plasma high density lipoprotein levels. *Gastroenterology* 1985; 89:1426-1429.
73. Schäfer JR, Hufnagel B, Maisch B, Krieglstein J. Warum trifft der Herzinfarkt immer das Herz? Marburger Hypothese zur Pathogenese der Atherosklerose. *Herz. Urban& Vogel* 2010. Vol 35, 3:192-197.
74. Seidel D. Studien zur Charakterisierung und zum Stoffwechsel des Lipoprotein-X (LP-X), des abnormen Lipoproteins der Cholestase. *Klinische Wochenschrift* 1977; 55:611-623.
75. Seidel D, Alaupovic P, Furman RH, McConathy WJ. A lipoprotein characterizing obstructive jaundice. II. Isolation and partial characterization of the protein moieties of low density lipoproteins. *J Clin Invest* 1970; 49:2396-2407.
76. Seidel D, Greten H, Geisen HP, Wengeler H, Wieland H. Further aspects on the characterization of high and very low density lipoproteins in patients with liver disease. *Eur J Clin Invest* 1972; 2:359-364.
77. Shirai K, Nema T, Hiroh Y, Itoh Y, Miyashita Y, Watanabe H. Clinical efficacy of the direct assay method using polymers for serum high density lipoprotein cholesterol. *J Clin Lab Anal* 1998; 11:82–86.
78. Siedel J, Schmuck R, Staepels et al Long-term stable liquid ready-to-use monoreagent for the enzymatic assay of serum or plasma triglycerides (GPO-PAP method). *AACC Meeting Abstract* 34. *Clin Chem* 1993; 39:1127.
79. Siekmeier R, März W, Gross W. Precipitation of LDL with sulfated polyanions: three methods compared. *Clin Chem Acta* 1988; 177:221-231.
80. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2010. *Gesundheit, Todesursachen in Deutschland 2009*, Seite 3.
81. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320:915-924.
82. Switzer S. Plasma lipoproteins in liver disease. I. Immunologically distinct low-density lipoproteins in patients with biliary obstruction. *J Clin Invest* 1967; 46:1855-1866.

83. Talafant E, Továrek J. Turbidimetric determination of lipoprotein-X in serum. *Clin Chim Acta*. 1979; 96:261-264.
84. The Lp-PLA2 Studies Collaboration. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet* 2010; 375: 1536.
85. Thomas L. Fettstoffwechsel. In: Thomas L. (Hrsg.), *Labor und Diagnose*. TH-Books, ISBN 3-98-052155-9. 2005. S.229ff.
86. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969; 6:24-27.
87. Turchin A, Wiebe DA, Seely EW, Graham T, Longo W, Soiffer R. Severe hypercholesterolemia mediated by lipoprotein X in patients with chronic graft-versus-host disease of the liver. *Bone Marrow Transplantation* 2005; 35:85–89.
88. Usui S, Kakuuchi H, Okamoto M, Mizukami Y, Okazaki M. Differential reactivity of two homogeneous LDL-cholesterol methods to LDL and VLDL subfractions, as demonstrated by ultracentrifugation and HPLC. *Clin Chem* 2002; 48:1946–1954.
89. Wahlefeld AW, Herz G, Bernt E. Modification of the Malloy-Evelyn method for a simple, reliable determination of total bilirubin in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 1972; 29:11-12.
90. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran sulfate-Mg<sup>2+</sup> precipitation procedure for quantitation of high density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982; 28:1379-1388.
91. Wieland H, Meissner-Heins H, Heins C, Seidel D. Die Bedeutung des Lipoprotein-X-Cholesterins in der Differentialdiagnostik der Cholestase. *Klin Wochenschr* 1982; 60:343–348.
92. Zhu X, Herzenberg AM, Eskandarian M, Maguire GF, Scholey JW, Connelly PW, Ng DS. A novel in vivo lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT)-deficient mouse expressing predominantly LpX is associated with spontaneous glomerulopathy. *Am J Pathol* 2004; 165:1269-1278.

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren an der Philipps - Universität Marburg:

Adamkiewicz, Arnold, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Baumann, Behr, Bien, Boudriot, Cetin, Daut, Dünne, Eilers, Feuser, Gerdes, Grundmann, Grimm, Grzeschik, Hertl, Hilt, Jungclas, Kalinowski, Kim-Berger, Kill, Klenk, Klose, König, Koolmann, Kühnert, Lang, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Rausch, Remschmidt, Renz, Röper, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Seitz, Steiniger, Sundermeyer, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Wennemuth, Werner, Westermann, Wulf.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. H. Renz, Direktor der Klinik für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Marburg, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut anzufertigen,

Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. H.G. Wahl für die wissenschaftliche Unterstützung und die Durchsicht dieser Arbeit,

Herrn Dr. Muhidin Soufi für die Einweisung in die Ultrazentrifugation im Lipidlabor des Universitätsklinikums Marburg,

und Frau Dr. Ileana Herzum für die anregenden Gespräche, Betreuung und für die Durchsicht dieser Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mich in jeder Situation unterstützen und mir Rückhalt geben. Ferner allen nahestehenden Freunden, auf deren Ehrlichkeit und Offenheit ich bisher in Schule, Studium oder Beruf vertrauen konnte.