

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 17, 1979, pp. 619–625

Mikrobestimmung von Lipoproteinlipiden im Serum

Von O. Leiß¹⁾, U. Murawski und H. Egge

Institut für Physiologische Chemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 8. Dezember 1978/21. Mai 1979)

Zusammenfassung: Durch Kombination einer Mikromethode zur Analyse von Serumlipiden mit bekannten Präzipitationsverfahren zur Isolierung von Lipoproteinen wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, aus 50 μ l Serum eine ausführliche Analyse der Lipidverteilung (Phospholipide, freies Cholesterin, verestertes Cholesterin, Triglyceride und freie Fettsäuren) in den einzelnen Lipoproteinen durchzuführen. Hierzu wurden die VLDL mit Heparin/Mg⁺⁺, die LDL mit Dextransulfat 500/Mg⁺⁺ und die HDL mit Dextransulfat/Mn⁺⁺ successive gefällt. Nach Zentrifugation der Präzipitate wurden die Lipide extrahiert und gravimetrisch quantitativ sowie nach dünnenschichtchromatographischer Trennung und Veraschung densitometrisch bestimmt (*van Gent, C. M.* (1968), *Z. Anal. Chem.* 236, 344–350; *Egge, H.* et al. (1970) *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 8, 488–491). Die aus den Seren von 12 gesunden Probanden erhaltenen Daten wurden mit den Ergebnissen verglichen, die nach entsprechender Lipoproteinisolierung mittels präparativer Ultrazentrifugation erhalten wurden (*Havel, R. J.* et al. (1955) *J. Clin. Invest.* 34, 1345–1353). Hierbei zeigten die Fraktionen der β -Lipoproteine ($d < 1,063$ g/ml) und HDL ($1,063 < d < 1,21$ g/ml) gute Übereinstimmung in ihrer relativen Lipidverteilung, während die Fraktionen der VLDL ($d < 1,006$ g/ml) und der VHDL ($d > 1,21$ g/ml) weniger gut mit den entsprechenden Fraktionen nach Fällung übereinstimmten. Bezogen auf die Gesamtlipide des Serums betrug die Wiederfindungsrate 95–105%. Die Variationskoeffizienten für die einzelnen Lipidklassen liegen bei den VLDL-Lipiden bei 15–20%, bei den LDL- und HDL-Lipiden bei 5–10% und bei den VHDL-Lipiden bei 10–15%. Für das Gesamtlipid, das der Quantifizierung der Einzelkomponenten zugrundegelegt wird, lag der Variationskoeffizient bei den LDL bei 4% und bei den HDL bei 6%.

The microanalysis of serum lipoprotein lipids

Summary: A method is described which allows the determination of phospholipids, free and esterified cholesterol, triglycerides and free fatty acids in lipoprotein fractions starting from 50 μ l of serum. Lipoproteins were separated by successive precipitation: VLDL with Heparin/Mg⁺⁺, LDL with Dextran sulfate/Mg⁺⁺ and finally HDL with Dextran sulfate/Mn⁺⁺. Lipids extracted from the precipitated lipoproteins were determined gravimetrically and by densitometry after thin layer chromatography and charring (*van Gent, C.M.* (1968), *Z. Anal. Chem.* 236, 344–350; *Egge, H.* et al. (1970) *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 8, 488–491). The results obtained from the serum of 12 adult healthy persons were compared with those from lipoprotein fractions separated by preparative ultracentrifugation (*Havel, R. J.* et al. (1955) *J. Clin. Invest.* 34, 1345–1353). The distribution of lipids in β -lipoproteins ($d < 1.063$ g/ml) and HDL ($1.063 < d < 1.21$ g/ml) prepared by both methods showed good agreement. Some differences were observed between VLDL ($d < 1.006$ g/ml) and VHDL ($d > 1.21$ g/ml) prepared either by precipitation or ultracentrifugation. Compared to the total lipid of the sera, recovery rates were 95–105%. Variation coefficients were in the range of 15–20% for VLDL lipids, 5–10% for LDL and HDL lipids and 10–15% for VHDL lipids. Gravimetrically determined total lipids had a variation coefficient of 4 and 6% for LDL and HDL respectively.

Einführung

Hyperlipoproteinämien gehören zu den häufigsten Stoffwechselkrankheiten und stellen einen Risikofaktor erster Ordnung für Coronarerkrankungen dar (1–4). Die Charakterisierung der Hyperlipoproteinämietypen erfolgt mittels verschiedener Methoden (5–7), wobei die präparative Ultrazentrifugation in Kombination mit Lipidanalysen der getrennten Fraktionen als Referenzmethode

dient. Für die klinische Routine ist sie jedoch zu teuer und zu zeitintensiv. Zur phänotypischen Klassifizierung der Hyperlipoproteinämien (8,9) dient die Lipoprotein-elektrophorese (8,10). Sie erlaubt jedoch nur eine qualitative bzw. semiquantitative Beurteilung der Lipoproteinverteilung und wird neuerdings für überflüssig gehalten

¹⁾ Neue Anschrift: Medizinische Klinik der Universität Bonn, Bonn-Venusberg.

(11,12). Neben immunologischen Methoden zur quantitativen Bestimmung von Apolipoprotein B (13,14) und Apolipoprotein A-I und A-II (15) wurden verschiedene Präzipitationsmethoden entwickelt (16,17). Sie beruhen meist auf einer Fällung der Apolipoprotein B enthaltenden Lipoproteine mittels Polyanionen wie Heparin, Dextransulfat u.ä. in Gegenwart zweiwertiger Kationen wie Ca^{++} , Mg^{++} oder Mn^{++} .

Da niedrige HDL²-Cholesterin-Konzentrationen mit einer erhöhten Incidenz für ischämische Coronarerkrankungen (18–22) und Cerebralerkrankungen (23) einhergehen und umgekehrt erhöhte HDL-Cholesterin-Werte, wie z.B. bei der familiären Hyper- α -lipoproteinämie, für ein vermindertes coronares Risiko und eine erhöhte Lebenserwartung zu sprechen scheinen (24), gewinnen besonders Methoden zur Quantifizierung der HDL in jüngster Zeit zunehmend an Bedeutung (25–27).

Diese Methoden erlauben eine quantitative Differenzierung in die „atherogenen“ β -Lipoproteine und die „antiatherogenen“ α -Lipoproteine. Die weitere Unterscheidung der prä- β -Lipoproteine (VLDL) und der β -Lipoproteine (LDL) ist vor allem für die Differenzierung der häufigsten Hyperlipoproteinämien vom Typ II b und IV von großer klinischer Bedeutung.

Hierfür wurden in den letzten Jahren von *Wilson & Spiger* (28) und *Ononogbu & Lewis* (29) Fällungsmethoden in Parallelansätzen vorgeschlagen, die, kombiniert mit automatisierten Triglycerid- und Cholesterinbestimmungen, durch geeignete Differenzbildung indirekt Aussagen über Cholesterin- und Triglyceridgehalt der VLDL, LDL und HDL erlauben.

In dieser Arbeit werden Fällungsmethoden beschrieben, die ausgehend von 50 μl Serum eine schnelle Quantifizierung der Lipoproteine und deren Lipidkomponenten erlauben.

Methodik

Probanden

Von 4 weiblichen und 8 männlichen gesunden normalgewichtigen Probanden (Alter 24–42 Jahre) wurden nach 14-stündigem Fasten jeweils 20 ml Blut aus der Cubitalvene entnommen und zur Gerinnung 2 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Von dem durch 15 min. Zentrifugation bei 3000 U/min abgetrennten Serum wurden 50 μl -Aliquots in vorbereitete Eppendorf-Gefäße

²) Abkürzungen:

VLDL	= very low density lipoproteins (d = < 1,006 g/ml)
LDL	= low density lipoproteins (d = 1,006–1,063 g/ml)
IDL	= intermediate density lipoproteins (d = 1,006–1,019 g/ml)
HDL	= high density lipoproteins (d = 1,063–1,21 g/ml)
VHDL	= very high density lipoproteins (d = > 1,21 g/ml)
CHE	= Cholesterinester
TG	= Triglyceride
CH	= freies Cholesterin
FFA	= freie Fettsäuren
PL	= Phospholipide
GCH	= Gesamtcholesterin
GL	= Gesamtlipid

transferiert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C tiefgefroren. Jeweils 5 ml-Aliquots wurden direkt zur Lipoproteinisolierung mittels präparativer Ultrazentrifugation verwandt.

Darstellung der Lipoproteine, quantitative Analyse der Lipide

Reagenzien

Dextransulfat 500 (Serva, Heidelberg)
Liquemin^(R) 10 000-Ampullen (Hoffmann La-Roche), alle übrigen Reagenzien (p.a.) wurden von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen.

Geräte

Beckman L 2-Ultrazentrifuge
Pyknometer
Christ-Zentrifuge, Photometer, Abdampfapparatur
Eppendorf-Mikroliter-System 3000
10 μl -Mikroliterspritze (Fa. Hamilton)
50 μl -Mikroliterspritze (Fa. Hamilton, ESGE bzw. Terumo)
Metallblock und Eisbad
Cahn-Gram Elektrowaage (Wägebereich 0,1–1000 μg , Präzision: $\pm 0,1 \mu\text{g}$)
Heizplatten 140°C
Aluminiumschälchen $\varnothing 14 \text{ mm}$

Die verwendeten Eppendorf-Gefäße (Volumen 1,5 ml) und Pipettenspitzen wurden zur Entfernung von Weichmachern 8 Stunden im Soxhlet mit Chloroform/Methanol (Volumina, 1 l + 1 l) extrahiert und anschließend 3 Stunden bei 90°C getrocknet (31).

Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation wurde nach der Methode von *Havel et al.* (32) durchgeführt. Zur VLDL-Trennung wurden 3–5 ml frisches Serum mit 0,15 mol/l NaCl (d = 1,006 g/ml) überschichtet und in einem Ti 50-Rotor 20 Stunden bei 15°C und 105 000 g in einer Beckman-Spinco L2-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Zur β -Lipoproteinrennung (VLDL+LDL) wurden 5 ml Serum mit KBr auf die Dichte d = 1,063 g/ml eingestellt und 20 Stunden bei 15°C und 105 000 g zentrifugiert. Bei einem Teil der Proben wurde anschließend zusätzlich ein Aliquot des Unterstandes d = > 1,063 g/ml auf d = 1,21 g/ml eingestellt und zur Isolierung der HDL 24 h bei 105 000 g zentrifugiert. Die erhaltenen Über- (HDL) und Unterstände (UZ-Rest; d = > 1,21 g/ml) wurden ebenso wie alle anderen Lipoproteinfraktionen bis zur weiteren Analyse (innerhalb 24 h) im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Dichte der verwendeten Salzlösungen wurde pyknometrisch kontrolliert.

Chemische Analysen

Zur quantitativen Cholesterin-Bestimmung wurden die einzelnen Lipoproteinfraktionen mit Chloroform/Methanol nach *Folch et al.* (33) extrahiert. Der Lipidextrakt wurde jeweils über eine Kieselsäule (HR 60) gereinigt. Hierzu wurden 5 g Kieselgel HR 60 in 25 ml Chloroform aufgeschlämmt und nach vollständiger Homogenisierung davon 1 ml in ein kapillar ausgezogenes Glasrohr ($\varnothing 7 \text{ mm}$, Höhe 15 cm) transferiert. Nach Waschen der Säule mit 3 ml Chloroform wurde die Lipidprobe aufgegeben und mit 20 ml Chloroform eluiert. Das Eluat wurde unter Stickstoff zur Trockne gebracht und das Cholesterin nach der Methode von *Zlatkis et al.* (34) bestimmt. Die Wiederfindungsrate bei in gleicher Weise über Säule gereinigten Standards betrug 95–100%.

Die relative Lipidverteilung der einzelnen Lipoproteinfraktionen wurde densitometrisch (30,31) ermittelt.

Fällung der Lipoproteine

Die in vorextrahierten (31) Eppendorf-Gefäßen tiefgefrorenen Serumproben (50 μl) wurden zum Auftauen 15 min bei Raumtemperatur belassen und anschließend im Metallblock im Eisbad inkubiert.

Zur VLDL- und LDL-Fällung wurde 1 ml Liquemin^(R) 10 000 mit 1 ml bidest. Wasser und 2 ml einer 2 mol/l MnCl_2 Lösung versetzt. Hiervon wurden 5 μl zu 50 μl Serum gegeben (Endkonz.: 250 000 USP-E/l Heparin und 0,045 mol/l MnCl_2) und 20 s geschüttelt. Nach 30 min Inkubation bei 0°C wurde 2 min bei 15 000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit einer 50 μl -Mikroliterspritze aspiriert und in ein zweites Reaktionsge-

fäß transferiert. Aus Sediment und Überstand wurden die Lipide mit jeweils 500 µl Chloroform/Methanol (Volumina, 80 ml + 50 ml) nach Folch et al. (32) extrahiert. Zur successiven Lipoprotein-fällung (Schema 1) wurden die Stammlösungen Heparin (5000 units/ml), MgCl₂ (2 mol/l), Dextransulfat 500 (20 g/l), Dextransulfat 500 (150 g/l) und MnCl₂ (5 mol/l) hergestellt und im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur VLDL-Fällung wurde die Heparinlösung (5000 units/ml) mit dem gleichen Volumen einer 2 mol/l MgCl₂ Lösung vermischt. Genau 5 µl dieser Lösung wurden bei eingetauchter Kanülenspitze langsam zu 50 µl Serum gegeben (Endkonz. Heparin 250 000 USP-E/l, Mg²⁺ 0,09 mol/l). Nach Durchmischen wurde 30 min bei 0 °C inkubiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig von der Oberfläche her und mit Kanülenöffnung an der dem Sediment abgewandten Wand des Reaktionsgefäßes möglichst durch zweimaliges Aspirieren von jeweils 25–30 µl in ein zweites vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Bei Seren nüchterner gesunder Personen verblieb am Boden des Reaktionsgefäßes ein diffus-trüber Niederschlag.

Bei Seren mit erhöhter Triglyceridkonzentration trat schon bei Zugabe von Heparin-Magnesium eine starke Trübung auf. Der entstandene Heparin-VLDL-Komplex flotierte z.T. bei Zentrifugation über einem trüben Unterstand. Es empfiehlt sich daher, starke hyperlipämische Seren vor Analyse mit bidest. Wasser zu verdünnen, um eine vollständige Fällung und einen klaren Überstand zu erhalten.

Zur LDL-Fällung wurden die Lösungen Dextransulfat 500 (20 g/l) und MgCl₂ (2 mol/l) zu gleichen Teilen vermischt. 5 µl dieser frischen Lösung wurden zu dem klaren Überstand nach VLDL-Fällung gegeben (Endkonz. Dextransulfat 500 ~ 0,9 g/l, MgCl₂ ~ 0,09 mol/l). Nach Durchmischen, 30 min Inkubation bei 0 °C und Zentrifugation (15 000 g, 2 min) wurde über einem scharfen Sediment ein klarer Überstand erhalten. Dieser wurde wie oben in ein drittes Reaktionsgefäß transferiert.

Zur Fällung der HDL wurden Dextransulfat 500 (150 g/l) und MnCl₂ (5 mol/l) zu gleichen Teilen vermischt. 5 µl dieser fri-

schen Lösung wurden zum Überstand nach LDL-Fällung zugegeben (Endkonz. Dextransulfat 500 ~ 6,8 g/l, MnCl₂ ~ 0,22 mol/l) (17). Nach Durchmischen, Inkubation 30 min bei 0 °C und Zentrifugation wurde der Überstand in ein viertes Reaktionsgefäß transferiert.

Lipidextraktion und gravimetrische Gesamtlipidbestimmung

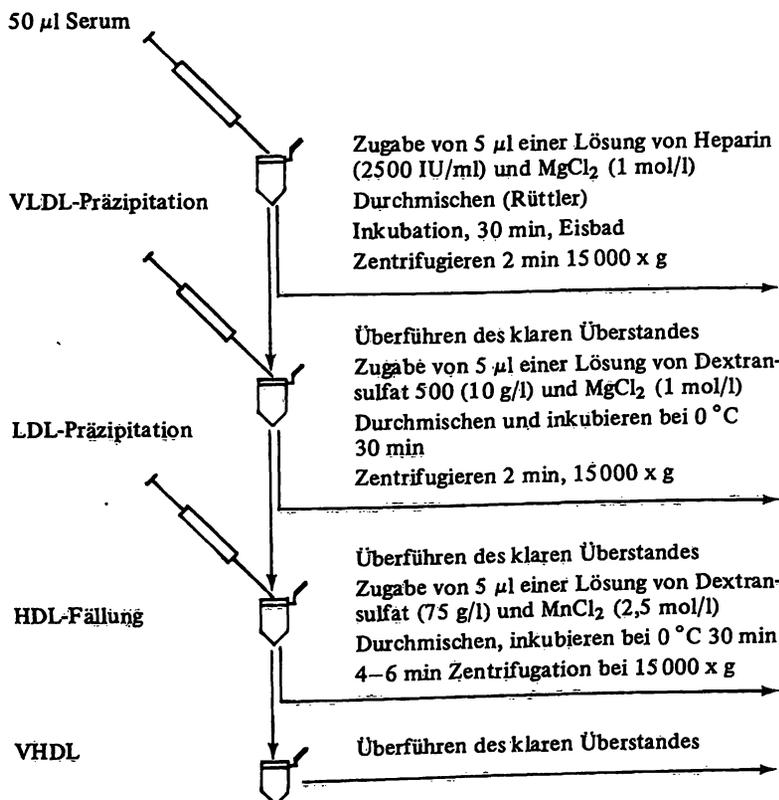
Zu den gefällten Lipoproteinen wurden jeweils 500 µl Chloroform/Methanol (Volumina, 80 ml + 50 ml) zugegeben, zum Überstand nach HDL-Fällung (VHDL) zusätzlich noch 50 µl Methanol. Nach 1 min Rütteln bei Raumtemperatur und Zentrifugation (2 min bei 15 000 g) wurde der Überstand mit einer kapillar ausgezogenen Pasteur-Pipette in ein weiteres Reaktionsgefäß transferiert. Die Extraktion wurde mit 500 µl Chloroform/Methanol wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden mit 200 µl bidest. Wasser versetzt, 30 s gerüttelt und anschließend 30 s zentrifugiert. Nach Waschen des Extraktes mit 200 µl bidest. Wasser wurde die obere wäßrige Phase abgehoben und verworfen. Ein eventuell auftretender Niederschlag an der Grenzschicht muß sorgfältig entfernt werden. Nach Eindampfen unter N₂ wurden die Lipide in exakt 100 µl (Mikroliterspritze) Chloroform/Methanol (Volumina, 20 ml + 10 ml) gelöst. Die gravimetrische Bestimmung des Gesamtlipids erfolgte aus jeweils 25 µl bzw. 50 µl bei den LDL-Lipiden. Gesamtlipidbestimmung, Dünnschichtchromatographie und Densitometrie wurden im Detail bereits (31) beschrieben.

Auswertung

Da freies und verestertes Cholesterin bestimmt wurden, erfolgte die Ermittlung des Gesamtcholesterins durch Addition des Cholesteringehaltes in den Cholesterinestern (=Cholesterinester x 0,56) und des freien Cholesterins.

Aus dem jeweiligen Gesamtlipid der gefällten Lipoproteine können die entsprechenden Lipoproteinkonzentrationen indirekt approximativ ermittelt werden. Hierzu wurden bei den VLDL

Schema 1. Lipoprotein-Fraktionierung



Quantifizierung der Lipide

1. Zweimalige Extraktion der Lipide nach Folch (33)
2. Waschen des Extraktes
3. Trocknen des Extraktes unter N₂
4. Auflösen in 100 µl CHCl₃:MeOH = 2:1
5. Gravimetrische Bestimmung des Gesamtlipids aus einem Aliquot
6. Trennung der Lipide durch Dünnschichtchromatographie
7. Densitometrische Bestimmung der Lipidverteilung nach Veraschen (31)

ein durchschnittlicher Proteinanteil von 10%, bei den LDL ein Proteinanteil von 25%, bei den HDL ein Proteinanteil von 50% (37,38) und bei den VHDL von 98% zugrundegelegt (38). Alle Analysen wurden doppelt durchgeführt. Die Berechnung von Standardabweichung und Variationskoeffizient erfolgte nach bekannten statistischen Methoden.

Ergebnisse

Tabelle 1 zeigt die prozentuale Lipidzusammensetzung verschiedener Lipoproteinfraktionen nach Ultrazentrifugation und nach Fällung. Die mit der Fällungsmethode erhaltene Relativverteilung der Gesamt- β -(VLDL+LDL) und α -Lipoproteine stimmt gut mit derjenigen nach Ultrazentrifugation überein, während die prozentuale Lipidzusammensetzung der VLDL nach Ultrazentrifugation bei $d=1,006$ g/ml und nach Fällung mit Heparin-MgCl₂ stärker differiert. Die gefällten VLDL enthalten mehr Cholesterinester und weniger Triglyceride + freie Fettsäuren als diejenigen nach Ultrazentrifugation.

Die prozentuale Lipidzusammensetzung der HDL nach Isolierung in der Ultrazentrifuge ($d=1,063-1,21$ g/ml) und nach Fällung mit Dextransulfat-MnCl₂ stimmt ebenfalls – bis auf die Phospholipide – relativ gut überein, die VLDL dagegen differieren stärker.

Wie aus der Tabelle ferner ersichtlich, wurden im Überstand nach HDL-Fällung (VHDL) sowohl relativ (in % der wiedergefundenen Gesamtphospholipide) als auch absolut (in mg/dl) geringfügig mehr Phospholipide gefunden als von anderen Autoren mittels Elektrophorese, Ultrazentrifugation und Polyanion-Fällung. Typische Densitogramme für die einzelnen Lipoproteinfraktionen sind in Abbildung 1 wiedergegeben.

Aus Tabelle 2 sind die Wiederfindungsraten nach schrittweiser Lipoproteinfraktionierung ersichtlich. Hierzu wurden die jeweiligen mg-Werte der verschiedenen Lipidkomponenten nach Fällung addiert und mit den entsprechenden Werten der in einem Parallelansatz durchgeführten Lipidbestimmung des Gesamtserums (31) verglichen. Die Wiederfindungsraten liegen im Durchschnitt bei 95–105%. Die Streuung beträgt für die einzelnen Lipidkomponenten (außer freie Fettsäuren) jeweils $\pm 10\%$ und liegt damit in der Größenordnung der Ultrazentrifugation-Methode (7).

Die Variationskoeffizienten der dreischrittigen Fällungsmethode (Tab. 2) liegen bei den VLDL-Lipiden zwischen 15–20%, bei den LDL- und HDL-Lipiden zwischen 5–10% und bei den VHDL-Lipiden zwischen 10–15%. Für das Gesamtlipid, das der Quantifizierung der Ein-

Tab. 1. Lipidzusammensetzung verschiedener Lipoprotein-Fraktionen nach Isolierung in der Ultrazentrifuge und nach Polyanionfällung (Mittelwerte nach Doppelbestimmungen von 12 verschiedenen Seren 4 ♀, 8 ♂).

* Die Wiederfindung nach Ultrazentrifugation und anschließender Entsalzung und Reinigung der Lipidextrakte über eine Kieselgelsäule (HR 60) betrug für Gesamtcholesterin aus HDL + (LDL + VLDL) 87,4%. Die angegebenen Werte sind für 100% Wiederfindung korrigiert.

	Ultrazentrifuge $d < 1,006$ g/ml	Fällung (% vom Gesamtlipid) VLDL	Ultrazentrifuge $1,063 < d < 1,21$ g/ml	Fällung HDL
Cholesterinester	18,6 \pm 2,6	29,6 \pm 3,8	34,6 \pm 5,8	32,8 \pm 1,9
Triglyceride			9,4 \pm 1,8	8,2 \pm 2,1
Triglyceride + freie Fettsäuren	43,6 \pm 7,8	31,7 \pm 5,1		
Cholesterin	11,2 \pm 1,9	11,7 \pm 0,8	10,3 \pm 1,6	9,9 \pm 1,1
Freie Fettsäuren			5,4 \pm 1,6	4,4 \pm 1,6
Phospholipide	26,3 \pm 6,0	27,1 \pm 4,6	40,2 \pm 5,2	44,7 \pm 3,3
Gesamtcholesterin (mg/dl)	17,8 \pm 7,9	13,0 \pm 3,4		
	$d < 1,063$ g/ml*	VLDL + LDL	$d > 1,21$ g/ml	HDL Überstand (VHDL)
Cholesterinester	38,0 \pm 2,7	36,7 \pm 2,2	20,0 \pm 3,7	27,8 \pm 3,1
Triglyceride	13,7 \pm 2,0	14,8 \pm 1,9	10,8 \pm 3,7	6,5 \pm 1,1
Cholesterin	13,2 \pm 0,9	13,2 \pm 0,7	7,6 \pm 1,8	6,9 \pm 0,4
Freie Fettsäuren	4,2 \pm 1,4	4,4 \pm 1,5	22,1 \pm 4,3	15,7 \pm 3,9
Phospholipide	30,9 \pm 2,3	30,9 \pm 2,5	39,6 \pm 6,1	43,1 \pm 2,7
Gesamtcholesterin (mg/dl)	112,3 \pm 17,3	113,7 \pm 10,8		
	$d > 1,063$ g/ml*	HDL + VHDL	Phospholipide der VHDL (HDL-Überstand)	
Cholesterinester	31,7 \pm 2,8	30,3 \pm 1,8	(% der Phospholipide des Gesamtserums)	
Triglyceride	6,7 \pm 2,2	8,2 \pm 2,1	10–15 (31,38)	16,8 \pm 4,1
Cholesterin	9,0 \pm 1,0	8,9 \pm 2,0		
Freie Fettsäuren	9,3 \pm 2,0	11,0 \pm 2,9	(mg/100ml)	
Phospholipide	43,3 \pm 2,9	41,7 \pm 3,8	30 (31,38)	35,6 \pm 9,9
Gesamtcholesterin (mg/dl)	59,7 \pm 11,0	59,7 \pm 9,7		

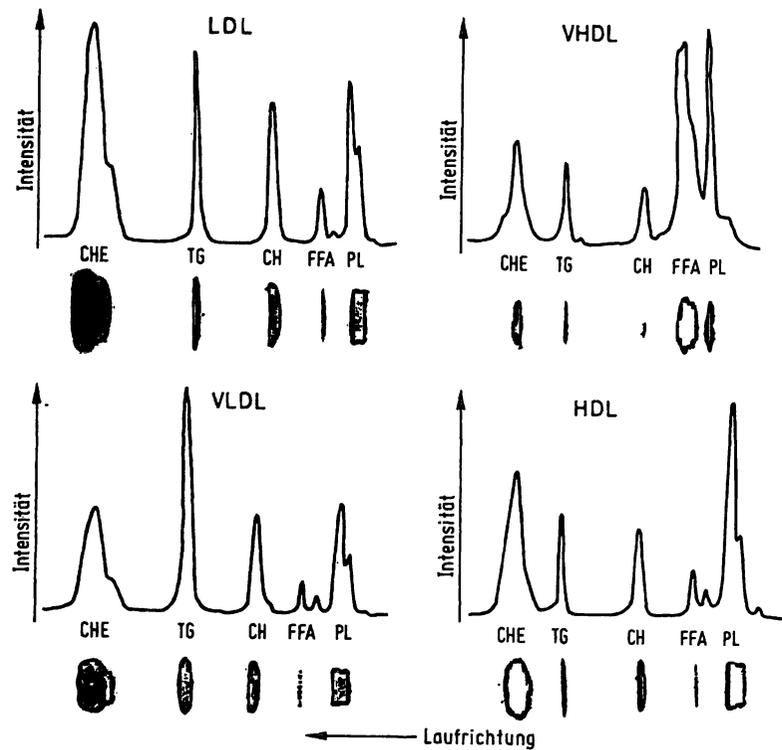


Abb. 1. Dünnschichtchromatographische Trennung der Lipide aus den gefällten Lipoproteinen mit Densitogrammen nach Veraschen.

Tab. 2. Variationskoeffizienten für die einzelnen Lipidkomponenten (in mg/dl) der verschiedenen Lipoproteinfraktionen (n=10) und Wiederfindung der einzelnen Lipidkomponenten nach successiver Fällung in % des Gesamtserums (Doppelbestimmung von 12 Seren).

* Das Gesamtlipid betrug für die VLDL = 36,9 mg/dl, für die LDL = 301 mg/dl, für die HDL = 203 mg/dl und für die VHDL = 99,4 mg/dl (Serum einer weiblichen Versuchsperson). Die prozentuale Verteilung gleicht den in Tab. 1 angegebenen Werten.

Successive Fällungsmethode*)	Variationskoeffizienten				Wiederfindungsraten (%)	
	VLDL	LDL	HDL	VHDL	Summe Fällung	Bereich
Cholesterinester	21,5	6,2	9,3	13,4	102,6 ± 9,1	84,8–117,3
Triglyceride	15,3	8,4	10,9	16,3	101,6 ± 9,1	90,5–117,7
Cholesterin	17,0	8,3	5,4	12,7	100,4 ± 10,8	82,0–116,2
Freie Fettsäuren	24,4	18,1	13,7	8,5	146,3 ± 30,9	98,7–208,2
Phospholipide	17,0	7,3	6,8	14,4	91,9 ± 9,1	80,3–110,4
Gesamtlipide	14,3	3,8	5,9	9,9	99,7 ± 4,3	95,2–108,9
Gesamtcholesterin	17,9	5,6	6,9	11,5	101,3 ± 6,5	90,3–113,8

zelkomponenten zugrunde gelegt wird, liegt der Variationskoeffizient bei den LDL bei 4% und bei den HDL bei 6%.

Tabelle 3 zeigt ein Serum mit leicht erhöhtem Gesamtcholesterin, bei dem nach Lipoproteinanalyse mittels successiver Fällung auf eine Hyperlipoproteinämie Typ II A mit erhöhtem LDL-Cholesterin geschlossen werden konnte.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, differieren die VLDL- und VHDL-Lipoproteine nach Fällung und nach Ultrazentrifugation in ihrer relativen Lipidzusammensetzung. Die Differenzen in der VLDL-Lipidzusammensetzung sind

wahrscheinlich methodisch bedingt. Während die Lipoproteinpartikel in der Ultrazentrifuge entsprechend ihrer Dichte getrennt werden, spielen für die Fällung Oberflächeneigenschaften eine wichtige Rolle. Wie von anderen Arbeitsgruppen gezeigt wurde, sind neben den Phospholipiden (39,40) positiv geladene Bereiche auf der Oberfläche der Apolipoproteine B und E für die Bindung mit Polyanionen wie Heparin oder Dextransulfat verantwortlich (41,42). Beim Abbau der VLDL reichern sich nach Abspaltung von Apolipoprotein C die Apolipoproteine B und E an der Oberfläche relativ zu den Phospholipiden an (37). Hierbei wird auch die elektrophoretische Mobilität der Partikel beeinflusst, so daß neben den

Tab. 3. Serum mit erhöhtem Gesamtcholesterin. Die zweischrittige Fällung weist auf eine Hyperlipoproteinämie Typ IIa hin (LDL-Cholesterin = 209 mg/dl). (Doppelbestimmung).

	VLDL		LDL		VLDL+LDL		HDL		Summe	
	Mittelwert	±	Mittelwert	±	Mittelwert	±	Mittelwert	±	Mittelwert	±
Cholesterinester	21,4	1,4	231	1,7	253	0,3	53,3	8,7	306	9,1
Triglyceride	21,6	1,9	120	6,1	142	8,0	13,2	0,1	155	7,9
Cholesterin	11,2	1,0	79,5	7,4	90,7	8,4	13,6	3,6	104	12,0
Freie Fettsäuren	5,3	0,5	18,0	0,5	23,2	0,1	21,4	8,3	45	8,2
Phospholipide	19,8	2,0	145	13,5	165	15,5	57,6	17,6	223	33,1
Gesamtcholesterin	23,1	1,8	209	6,5	232	8,2	43,4	1,3	276	6,9
Gesamtlipide	79,3	5,7	594	25,8	673	31,5	159	20,6	832	52,1

in α_2 -Position wandernden VLDL eine langsamer wandernde β -VLDL-Bande nachweisbar ist (43). Wie von Kook et al. (44) gezeigt wurde, werden durch Heparin-MgCl₂ bevorzugt diese β -VLDL gefällt. Die relative Lipidzusammensetzung der gefällten VLDL (Tab. 1) stimmt gut mit Angaben anderer Autoren über die Lipidzusammensetzung der IDL (d=1,006–1,019 g/ml) (37,43) bzw. der VLDL und IDL beim Typ III (45) überein. Nach neueren Untersuchungen kann der Anteil an IDL, dem physiologischen Abbauprodukt der VLDL (37,43) in VLDL-Präparationen von Normalpersonen bis zu 50% betragen (45). Von der Lipidzusammensetzung und vom Fällungsmechanismus her ist daher die Annahme berechtigt, daß bei Fällung mit Heparin-MgCl₂ bevorzugt kleinere, bereits metabolisierte VLDL-Partikel („remnant VLDL“ und IDL) erfaßt werden.

Vergleicht man die für die beschriebene Fällungsmethode erhaltenen Variationskoeffizienten (Tab. 2) mit Angaben von Carlson über Variationskoeffizienten der Ultrazentrifugen-Methode (7), so liegen die Werte für LDL-Gesamtcholesterin, LDL-Triglyceride und HDL-Gesamtcholesterin, HDL-Triglyceride in derselben Größenordnung (5–8%). Von anderen Autoren wurden für andere Mikromethoden Variationskoeffizienten von 4% für LDL-Gesamtcholesterin (46,47) und 2% (46) bzw. 7% (47) für HDL-Gesamtcholesterin angegeben.

Bei den in geringer Konzentration vorkommenden VHDL liegen die Variationskoeffizienten zwischen 10–15% und bei den VLDL zwischen 15–20%. Bei niedrigem Gesamtlipid der VLDL (< 30 mg/dl) nähert sich die Methode bei der dünnschichtchromatographischen Bestimmung der Lipidverteilung der unteren Nachweisgrenze, wodurch der relative Fehler größer wird. Jedoch auch mit anderen Methoden wurden für das VLDL-Gesamtcholesterin Variationskoeffizienten von 10% (46), 13% (47) und 21% (46) berichtet. Die Absolutwerte für das VLDL-Gesamtcholesterin lagen bei einer Mikro-Airfuge-Methode (46) 30–40% unter und bei einer elektrophoretischen Methode kombiniert mit gaschromatographischen Cholesterinbestimmungen (47) 50% über den entsprechenden Werten nach Ultrazentrifugation.

Die Unterschiede in den VHDL – höherer Gehalt an freien Fettsäuren und niedrigerer Gehalt an Phospholipiden und Cholesterinestern bei der Ultrazentrifugation – scheinen methodisch bedingt zu sein. Lipolyse während der sequentiellen Ultrazentrifugation kann kaum vermieden werden. Der gegenüber anderen Methoden (17,31,38) (Tab. 1) geringfügig höhere Phospholipidgehalt in den VHDL könnte auf eine unvollständige Fällung der HDL zurückzuführen sein. Hierfür spricht auch die Beobachtung, daß der Überstand nach HDL-Fällung in einzelnen Fällen noch leicht trübe war. Zur Umgehung dieser Fehlerquelle wird empfohlen, die Zentrifugationsdauer auf 10 min zu erhöhen.

Für die Mehrzahl klinischer Fragestellungen erscheint jedoch eine Differenzierung der Lipoproteine in HDL und VHDL nicht erforderlich. Der Überstand nach LDL-Fällung kann als HDL-Äquivalent (α -Lipoproteine) angesehen werden. Diese für den klinischen Gebrauch empfohlene zweischrittige Fällungsmethode hat im Vergleich mit anderen Methoden zur Lipoproteinanalyse folgende Vorteile:

1. Sie ermöglicht eine approximative Bestimmung der VLDL, LDL und HDL ohne Ultrazentrifugation.
2. Die Lipide dieser Lipoproteine können quantitativ bestimmt werden.
3. Die Variationskoeffizienten sind für die Hauptlipidkomponenten der LDL und HDL mit Variationskoeffizienten nach Ultrazentrifugation vergleichbar.
4. Die Methode ist eine Mikromethode und benötigt nur 50 μ l Serum.
5. Sie ist an Geräte adaptiert, die in den meisten Kliniklaboratorien vorhanden sind.
6. Sie ist kostensparend und leicht zu erlernen.
7. Es können auch tiefgefrorene Serumproben analysiert werden.

Die Methode ist geeignet zur Charakterisierung von Hyperlipoproteinämien, vor allem bei leichten Formen, bei denen die Typisierung aufgrund grenzwertiger oder minimaler Triglycerid- und/oder Cholesterinwerte pro-

blematisch ist. So kann durch quantitative LDL-Cholesterin-Bestimmung und VLDL-Triglycerid-Bestimmung zwischen den häufigsten Hyperlipoproteinämie-Typen IIa, IIb und IV differenziert werden (siehe Beispiel Tab. 3).

Weiter vereinfacht auf eine einstufige β -Lipoprotein-fällung kann die Methode auch zur Bestimmung des Cholesterins der HDL bei Risikogruppen und wegen der geringen benötigten Serummenge auch bei Neugeborenen angewandt werden.

Literatur

1. Kannel, W. B., Castelli, W. P., Gordon, T. & McNamara, P. M. (1971): *Ann. Intern. Med.* 74, 1–12.
2. Gustavson, A., Elmfeldt, D., Wilhelmsen, L. & Tibblin, G. (1972): *Circulation* 46, 709–716.
3. Goldstein, J. L., Hazzard, W. R., Schrott, H. G., Bierman, E. L., Motulsky, A. G., Levinski, M. J. & Campell, E. D. (1973): *J. Clin. Invest.* 52, 1533–1543.
4. Carlson, L. A. & Ericsson, M. (1975): *Atherosclerosis* 21, 435–450.
5. Hatch, F. T. & Lees, R. S. (1968): *Adv. Lipid Res.* 6, 1–68.
6. Lindgren, F. T., Jensen, L. C. & Hatch, F. T. (1972): "Blood Lipids and Lipoproteins: Quantitation, Composition and Metabolism", (Nelson, G. J., ed.) Wiley-Interscience, New York, pp. 181–274.
7. Carlson, K. (1973): *J. Clin. Pathol.* 26, Suppl. 5, 32–37.
8. Fredrickson, D. S., Levy, R. I. & Lees, R. S. (1967): *New Engl. J. Med.* 276, 34–44, 94–103, 148–156, 215–224, 273–281.
9. Beaumont, J. L., Carlson, L. A., Cooper, G. R., Fejfar, Z., Fredrickson, D. S. & Strasser, T. (1972): *Circulation* 45, 501–508.
10. Greten, H., Seidel, D., Walter, B. & Kolbe, J. (1970): *Dtsch. Med. Wochenschr.* 95, 1716–1723.
11. Fredrickson, D. S. (1975): *Circulation* 51, 209–211.
12. Iammarino, R. M. (1975): *Clin. Chem.* 21, 300–308.
13. Lees, R. S. (1970): *Science* 169, 493–495.
14. Durrington, P. N., Whicher, J. T., Warren, C., Bolton, C. H. & Hartog, M. (1976): *Clin. Chim. Acta* 71, 95–108.
15. Cheung, M. C. & Albers, J. J. (1977): *J. Clin. Invest.* 60, 43–50.
16. Cornwell, D. G. & Kruger, F. A. (1961): *J. Lipid Res.* 2, 110–134.
17. Burstein, M., Scholnick, H. R. & Morfin, R. (1970): *J. Lipid Res.* 11, 583–595.
18. Miller, G. J. & Miller, N. E. (1975): *Lancet* 1, 16–19.
19. Rhoads, G. G., Gulbrandsen, C. L. & Kagan, A. (1976): *New Engl. J. Med.* 294, 293–298.
20. Miller, G. J., Miller, N. E. & Ashcroft, M. T. (1976): *Clin. Sci. Mol. Med.* 51, 475–482.
21. Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B. & Dawber, T. R. (1977): *Amer. J. Med.* 62, 707–714.
22. Castelli, W. P., Doyle, J. T., Gordon, T., Hames, C. G., Hjortland, M. C., Hulley, S. B., Kagan, A. & Zukel, W. J. (1977): *Circulation* 55, 767–772.
23. Rössner, S., Kjellin, K. G., Mettinger, K. L., Siden, A. & Söderström, C. E. (1978): *Lancet* 1, 577–579.
24. Glueck, C. J. (1976): *Artery* 2, 196–198.
25. Burstein, M. & Samaille, J. (1960): *Clin. Chim. Acta* 5, 609.
26. Bachorik, P. S., Woos, P. D., Albers, J. J., Steiner, P., Dempsey, M., Kuba, K., Warnick, R. & Karlsson, L. (1976): *Clin. Chem.* 22, 1828–1834.
27. Ishikawa, T. T., Brazier, J. B., Steiner, P. M., Stewart, L. E., Gartside, P. S. & Glueck, C. J. (1976): *Lipids* 11, 628–633.
28. Wilson, D. E. & Spiger, M. (1973): *J. Lab. Clin. Med.* 82, 473–482.
29. Ononogbu, I. C. & Lewis, B. (1976): *Clin. Chim. Acta* 71, 397–402.
30. van Gent, C. M. (1968): *Z. Anal. Chem.* 236, 344–350.
31. Egge, H., Murawski, U., Müller, J. & Zilliken, F. (1970): *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 8, 488–491.
32. Havel, R. J., Eder, H. A. & Bragdon, J. H. (1955): *J. Clin. Invest.* 34, 1345–1353.
33. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. (1957): *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
34. Zlatkis, A., Zak, B. & Boyle, A. J. (1953): *J. Lab. Clin. Med.* 41, 486–492.
35. Lutmer, R. F., Parson, D., Glueck, C. J., Morrison, J. A., Stewart, L., Brazier, J. B., Buncher, C. R. & Ishikawa, T. T. (1974): *J. Lipid Res.* 15, 611–614.
36. Kostner, G. M. (1976): *Clin. Chem.* 22, 695.
37. Augustin, J., Middelhoff, G. & Brown, W. V. (1976): „Fettstoffwechsel“, (Schettler, G., Greten, H., Schlierf, G. & Seidel, D. eds.) *Handbuch der Inneren Medizin* (Schwiegk, H. ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 219–264.
38. Skipski, V. P. (1972): „Blood Lipids and Lipoproteins: Quantitation, Composition and Metabolism“, (Nelson, G. J. ed.) Wiley-Interscience, New York, pp. 471–583.
39. Cham, B. E. (1976): *Clin. Chem.* 22, 1812–1816.
40. Kim, Y. C. & Nishida, T. (1977): *J. Biol. Chem.* 252, 1243–1249.
41. Shelburne, F. A. & Quarfordt, S. H. (1977): *J. Clin. Invest.* 60, 944–950.
42. Mahley, R. W. & Innerarity, T. (1977): *J. Biol. Chem.* 252, 3980–3986.
43. Pagnan, A., Havel, R. J., Kane, J. P. & Kotite, L. (1977): *J. Lipid Res.* 18, 613–622.
44. Kook, A. I., Eckhaus, A. S. & Rubinstein, D. (1970): *Can. J. Biochem.* 48, 712–724.
45. Gianturco, S. H., Gotto, A. M. jr., Jackson, R. L., Patsch, J. R., Sybers, H. D., Taunton, O. D., Yeshurun, D. L. & Smith, L. C. (1978): *J. Clin. Invest.* 61, 320–328.
46. Bronzert, T. J. & Brewer, H. B. jr. (1977): *Clin. Chem.* 23, 2089–2098.
47. Heuck, C. C., Nothelfer, A., Raetzer, H. & Schlierf, G. (1977): *J. Lipid Res.* 18, 259–263.

Prof. Dr. H. Egge
 Institut für Physiologische Chemie
 der Universität Bonn
 Nußallee 11
 5300 Bonn

