

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 19, 1981, pp. 273–278

Zur Richtigkeit der HDL-Cholesterin- und HDL-Apolipoprotein A-I-Bestimmung nach Phosphorwolframsäure/MgCl₂-Präzipitation Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine

Von G. Assmann, H. Schriewer und H. Funke

Zentrallaboratorium der Medizinischen Einrichtungen der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

(Eingegangen am 1. September/2. Dezember 1980)

Zusammenfassung: Das bei routinemäßiger HDL-Cholesterinbestimmung in der Praxis angewandte Fällungsverfahren zur Abtrennung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ erlaubt bei optimaler Reagentienkonzentration eine vollständige Präzipitation der Apolipoprotein B-haltigen Lipoproteine bei nur geringer Mitpräzipitation der HDL. Die Richtigkeit der Fällung wird in hypertriglyceridämischen Seren bis 4,0 mmol/l nicht beeinflusst. Auch bei stärkerer Hypertriglyceridämie wird in der Regel eine komplette Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine sowie eine nahezu vollständige Wiederfindung der HDL beobachtet. Neben HDL-Cholesterin kann HDL-Apolipoprotein A-I heute ohne großen Aufwand mit kinetischer Nephelometrie bestimmt werden. In Seren mit Triglyceridgehalten > 4,56 mmol/l sollte die Quantifizierung von HDL-Apolipoprotein A-I nicht im Originalserum, sondern im Überstand nach Präzipitation der Apolipoprotein B-haltigen Lipoproteine erfolgen.

Accuracy of HDL-cholesterol and HDL-apolipoprotein A-I determinations after phosphotungstate/MgCl₂-precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins

Summary: With optimal concentrations of reagents a complete precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins and only a small coprecipitation of HDL can be achieved using the phosphotungstate/MgCl₂ precipitation method. The accuracy of the precipitation is not influenced by triglyceride concentrations < 4.0 mmol/l. Similarly, in most hypertriglyceridaemic sera (> 4.0 mmol/l) a complete precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins and a complete recovery of HDL can be observed. In addition to the HDL cholesterol determination, apolipoprotein A-I was determined by kinetic nephelometry. In hypertriglyceridaemic sera (> 4.56 mmol/l) precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins must be carried out prior to the nephelometric determination of apolipoprotein A-I.

Einleitung

Im Rahmen des Screenings und der Therapiekontrolle von Lipidstoffwechselstörungen kommt der Analytik der high density Lipoproteine (HDL) als Risikoindikator der kardiovaskulären Erkrankungen eine zunehmende Bedeutung zu (1–3). Voraussetzung zur analytischen Bestimmung der HDL-Komponenten (z. B. HDL-Cholesterin, HDL-Apolipoproteine) ist in der Regel die Isolierung der HDL durch Abtrennung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine (very low density Lipoproteine (VLDL), low density Lipoproteine (LDL), Lipoprotein (a) Lp (a)). Referenzmethode der HDL-Isolierung ist die präparative Darstellung der HDL durch Ultrazentrifugation. Dieses Verfahren ist zeitraubend, technisch aufwendig und von limitierender Kapazität. Als Routinemethode wurden deswegen Verfahren zur Präzipitation Apolipoprotein

B-haltiger Lipoproteine mit Polyanionen und divalenten Kationen eingeführt. Diese Verfahren setzen voraus, daß Apolipoprotein B-haltige Lipoproteine vollständig ausgefällt werden, ohne daß die HDL mitpräzipitiert werden. Es besteht darüber hinaus das Problem, ob aus den Cholesterinwerten im Präzipitationsüberstand auf die HDL-Masse und umgekehrt geschlossen werden kann und ob bzw. inwieweit die Bestimmung von HDL-Apolipoproteinen die Bestimmung von HDL-Cholesterin ergänzt.

Zu diesen Fragen, insbesondere zum Problem der Richtigkeit der HDL-Cholesterin- und HDL-Apolipoprotein A-I-Bestimmung mittels Präzipitationsverfahren soll in der vorliegenden Arbeit anhand eigener Ergebnisse Stellung genommen werden. Die Möglichkeiten und Grenzen der analytischen Aussage dieser Bestimmungen werden diskutiert.

Methoden

Probenmaterial

Als Versuchsmaterial wurden Seren aus der Untersuchungsreihe „Prospektive epidemiologische Studie bei Betriebsangehörigen im Raum Westfalen zur Verbesserung der Frühdiagnostik der koronaren Herzkrankheit“ verwandt (2). Die Blutentnahme erfolgte morgens nüchtern in einem speziell hierfür eingerichteten Omnibus. Das gewonnene Serum wurde bei + 4 °C aufbewahrt und traf spätestens 3 Tage nach Blutentnahme in unserem Laboratorium ein. Die Analytik erfolgte innerhalb 24 Stunden nach Erhalt der Serumproben.

HDL-Cholesterin-Analytik

Die Präzipitation Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ erfolgte mit dem Test „Boehringer Mannheim“ (Test-Nr.: 400971); die Cholesterinbestimmung erfolgte enzymatisch mit der Cholesterinoxidase/4-Aminophenazon-Phenol-Methode (Boehringer Mannheim) (Test Combination Cholesterin Nr.: 187313).

HDL-Isolierung durch Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation wurde im 40.3 Rotor (Beckman Instruments) durchgeführt. Je 5 ml der Serumproben wurden mit einer 0,15 mol/l NaCl enthaltenden Lösung verdünnt und 24 Stunden bei + 4 °C bei 39000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Die durch „Schneiden“ der Röhren gewonnene Fraktion > 1,006 kg/l wurde mit festem Kaliumbromid auf eine Dichte von 1,063 kg/l eingestellt, mit einer Kaliumbromid-Lösung der Dichte 1,063 kg/l überschichtet und 24 Stunden bei 39000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Die hierbei gewonnene Fraktion > 1,063 kg/l wurde mit festem Kaliumbromid auf eine Dichte von 1,21 kg/l eingestellt, 48 Stunden bei 39000 Umdrehungen/min zentrifugiert und die HDL enthaltende Fraktion 1,063–1,21 kg/l nach erschöpfender Dialyse gegen 0,15 mol/l NaCl bei + 4 °C aufbewahrt.

Präparation selektiv im Apolipoproteinanteil ¹⁴C-markierter HDL

Isoliertes Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein A-II (4) bzw. mit Chloroform-Methanol (2 + 1) delipidierte HDL (= Apolipoprotein HDL) (5) wurden nach der Methode von Krempler et al. (6) mit [¹⁴C]Formaldehyd (Amersham Buchler, 3300 Braunschweig, spezifische Aktivität, 699,3 MBq/mmol) reduktiv ¹⁴C-methyliert. Der Einbau der radioaktiv markierten Apolipoproteine in HDL wurde wie folgt durchgeführt: 1 ml [¹⁴C]Apolipoprotein (0,02–0,1 g/l) wurden mit 4 ml Serum versetzt, über Nacht bei 4 °C inkubiert und [¹⁴C]HDL durch Ultrazentrifugation im Dichtebereich 1,063–1,21 kg/l isoliert (siehe oben). Das mit [¹⁴C]Apolipoprotein A-I rekonstituierte HDL wird im folgenden als [¹⁴C]A-I-HDL, das mit [¹⁴C]Apolipoprotein A-II rekonstituierte HDL als [¹⁴C]A-II-HDL und das mit [¹⁴C]Apolipoprotein HDL rekonstituierte HDL als [¹⁴C]HDL bezeichnet.

HDL-Apolipoprotein A-I-Quantifizierung

Zur Messung der Konzentration des an HDL gebundenen Apolipoprotein A-I wurden Antikörper benutzt, die durch Immunisierung von Kaninchen mit durch Ultrazentrifugation isolierter HDL₃ (Dichte 1,125–1,21 kg/l) gewonnen wurden (Behring-Werke Marburg, Lot-Nr.: 103304 und 3404). Die Antikörper waren spezifisch in Bezug auf HDL-gebundenes Apolipoprotein A-I und zeigten gegenüber freiem Apolipoprotein A-I keine Immunreaktion. Bei der Immunpräzipitation nach Ouchterlony bestand kein Unterschied zwischen den durch Immunisierung gegen HDL-Apolipoprotein und den durch Immunisierung gegen Apolipoprotein A-I gewonnenen Antikörpern, wenn isoliertes HDL (d = 1,063–1,21 kg/l) als Antigen benutzt wurde. Die nephelometrischen Analysen wurden mit dem Beckman-Immuno-Chemical-System (kinetische Nephelometrie, Quarz-Iodid-Lampe, Vorwärtsstreuung, Lichtsammlung im Winkel von 70°, Manual-Mode-Karte M 33 (Spezifizierung der Zeitkonstanten und der Verstärkerstufe)) durchgeführt: in Spezialküvetten mit Rührer wurden pipettiert: 600 µl einer

phosphatgepufferten Polyethylenglykol-Lösung (Beckman ICS-System), 42 µl verdünnte Probe (100 µl Probe plus 10 ml 0,15 mol/l NaCl) und 42 µl verdünnte Antikörperlösung (1:2 mit 0,15 mol/l NaCl). Das Zeitintervall zwischen Antigen- und darauffolgender Antikörperzugabe betrug maximal 10 Sekunden, unmittelbar nach Antikörperzugabe wurde die Reaktionsaufzeichnung von Hand gestartet. Zur Kalibrierung wurden mit 0,15 mol/l NaCl-Lösung verdünnte Standardlösungen (1:30 bis 1:960) eingesetzt (Behring Werke Marburg, Lot-Nr.: 1001 und 74L). Die angegebenen Standards waren mit radialer Immundiffusion oder Laser-Nephelometrie auf einen Primärstandard kalibriert. Der Primärstandard wurde durch Ultrazentrifugation in einem Dichtebereich von 1,063–1,21 kg/l isoliert, gegen 0,15 mol/l NaCl dialysiert, lyophilisiert und seine Zusammensetzung chemisch, gravimetrisch und mit verschiedenen immunchemischen Methoden ermittelt (7). Die Standards enthielten 0,91 g/l (Charge 1001) bzw. 1,31 g/l (Charge 74L) HDL-gebundenes Apolipoprotein A-I.

Als weitere Bestimmung zur HDL-Apolipoprotein A-I-Quantifizierung wurde die radiale Immundiffusion durchgeführt (Behring-Werke, Marburg, Charge-Nr.: 3658).

Ergebnisse

Richtigkeit und Präzision der Phosphorwolframsäurefällung

Die Richtigkeit der HDL-Cholesterinbestimmung mittels Präzipitationsverfahren kann in erster Linie durch Ko-präzipitation von HDL und inkomplette Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine beeinflusst werden. Das Ausmaß der möglichen Mitpräzipitation der HDL wurde durch nephelometrische Apolipoprotein A-I-Bestimmung (siehe unten) sowie durch Zugabe von Tracermengen markierter HDL ([¹⁴C]A-I-HDL, [¹⁴C]A-II-HDL, [¹⁴C]HDL) zu frischen Seren überprüft. Es wurden 90 bis 100% der zugegebenen Radioaktivität im Überstand nach Fällung mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ wiedergefunden (Tab. 1). Apolipoprotein B-haltige Lipoproteine werden praktisch vollständig präzipitiert: im Fällungsüberstand nach Präzipitation mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ war weder mit der SDS-Gelelektrophorese noch mit der kinetischen Nephelometrie Apolipoprotein B nachweisbar (Nachweisgrenze für Apolipoprotein B mit der kinetischen Nephelometrie: < 2 mg/dl).

Tab. 1. Radioaktivitätswiederfindung im Serumüberstand nach Fällung mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂. Zugabe von Tracermengen [¹⁴C]A-I-HDL, [¹⁴C]A-II-HDL oder [¹⁴C]HDL zu frischen Seren.

	Radioaktivität im Überstand nach Fällung mit Phosphorwolframsäure/MgCl ₂ (% der zugefügten Radioaktivität)
[¹⁴ C]A-I-HDL	95,9 ± 7,75 (n = 5)
[¹⁴ C]A-II-HDL	100,8 ± 4,2 (n = 5)
[¹⁴ C]HDL	94,4 ± 4,8 (n = 5)

Die Regressionsanalyse der nach Fällung mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ (y) und nach Ultrazentrifugation (d = 1,063–1,21 kg/l) (x) ermittelten Meßdaten läßt eine gute Korrelation erkennen (r = 0,96, y = 1,09 x – 0,148, n = 120).

Die ermittelten Variationskoeffizienten des HDL-Cholesterin (Phosphorwolframsäurefällung) für die Präzision in der Serie zeigten eine deutliche Abhängigkeit vom Triglyceridgehalt der Proben. In Proben mit Triglyceridgehalten von > 1,60 mmol/l war die Präzision deutlich schlechter (VK 2,3%) als in Proben mit Triglyceridgehalten von < 1,60 mmol/l (VK 1,15%). Nach unseren Beobachtungen mit lyophilisierten Kontrollseren (Precilip 662) kommt es bei täglicher Auflösung des lyophilisierten Materials und anschließender Fällung mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ zu Variationskoeffizienten (von Tag zu Tag), die weitaus höher sind (8%) als bei Verwendung der gleichen, jedoch über längere Zeit gelöst aufbewahrten Materialien (4%).

Nach Präzipitation Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine (low density Lipoproteine, very low density Lipoproteine, Lipoprotein (a)) mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ und anschließender enzymatischer Cholesterinbestimmung (Cholesterinoxidase/4-Aminophenazon-Phenol) fanden wir bei normolipämischen Versuchspersonen eine HDL-Cholesterinkonzentration von 1,17 ± 0,33 mmol/l (n = 942) bei Männern und von 1,40 ± 0,37 mmol/l (n = 653) bei Frauen (Mittelwert ± Standardabweichung).

Empfindlichkeit der HDL-Cholesterinbestimmung

Bei Verdünnung des Präzipitationsüberstandes nach Fällung mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ mit 0,15 mol/l NaCl-Lösung fanden wir mit der Cholesterinoxidase/4-Aminophenazon-Phenol-Methode eine untere Nachweisgrenze für die Cholesterinbestimmung im HDL von 0,052 mmol/l. Die Richtigkeit der HDL-Cholesterinbestimmung bei sehr niedrigen HDL-Cholesterinkonzentrationen wurde mittels Linearitätsprüfung mit Serum

von Patienten mit Analphalipoproteinämie (Morbus *Tangier*) getestet (Tab. 2); nach diesen Ergebnissen liefert die Phosphorwolframsäure/MgCl₂-Fällung und anschließende enzymatische Cholesterinbestimmung auch bei niedrigen HDL-Konzentrationen hinreichend genaue Werte.

HDL-Apolipoprotein A-I-Konzentration im Überstand nach Fällung mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂

Die mit kinetischer Nephelometrie in Nativseren gemessenen HDL Apolipoprotein A-I-Werte sind gut mit den Daten vergleichbar, die durch radiale Immundiffusion ermittelt wurden (r = 0,968; y = 1,22 x – 0,012). Bei Gegenüberstellung der mit kinetischer Nephelometrie bestimmten HDL-Apolipoprotein A-I-Konzentrationen des Überstandes nach Präzipitation mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ mit den mit derselben Methode gemessenen HDL-Apolipoprotein A-I-Konzentrationen in den jeweiligen Ursprungsseren weichen einige Punkte in der Darstellung der Wertepaare erheblich von der Masse der dargestellten Punkte ab (Abb. 1.). Die abweichenden Wertepaare beziehen sich ausschließlich auf Seren mit Triglyceridgehalten > 4,56 mmol/l. Die Berechnung der Korrelation und Regression unter Weglassen der in Seren mit Triglyceridgehalten > 4,56 mmol/l ermittelten Daten ergab einen Korrelationskoeffizienten von r = 0,959 sowie eine gute Übereinstimmung der im Originalserum und im Apolipoprotein B-freien Überstand gemessenen Daten (y = 0,935 x + 0,058). Bezüglich der im Originalserum und im Präzipitationsüberstand der Proben mit Triglyceridgehalten > 4,56 mmol/l gemessenen HDL-Apolipoprotein A-I-Werte ermittelten wir einen Korrelationskoeffizienten von r = 0,722 sowie die Regressionsgeradengleichung y = 0,710 x + 0,387. Bei Gegenüberstellung der HDL-Cholesterinkonzentrationen mit den durch kinetische Nephelometrie im Fällungsüberstand ermittelten HDL-Apolipoprotein A-I-Konzentrationen fällt eine erhebliche Streuung der Meßpunkte auf (Abb. 2) (r = 0,799, y = 1,180 x – 0,461).

Tab. 2. Linearität der HDL-Cholesterinbestimmung. Verdünnung eines aus Normalseren gemischten Poolserums mit dem Serum eines Patienten mit Analphalipoproteinämie (Morbus *Tangier*) vor Fällung mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂.

Verdünnung eines Poolserums (HDL-Cholesterin 1,308 mmol/l) mit der Patientenprobe (HDL-Cholesterin 0,036 mmol/l)	HDL-Cholesterin		Abweichung (mmol/l)	Abweichung (%)
	gemessener Wert (mmol/l)	aufgrund der Verdünnung berechneter Wert (mmol/l)		
Unverdünnt	1,308	–		
1:1,25	1,059	1,054	+ 0,005	+ 0,5
1:1,67	0,795	0,800	- 0,005	- 0,6
1:2,5	0,528	0,544	- 0,016	- 2,9
1:5,0	0,259	0,290	- 0,031	- 10,7
1:10	0,145	0,163	- 0,018	- 11,9
1:20	0,083	0,101	- 0,018	- 17,8
Patientenprobe	0,036			

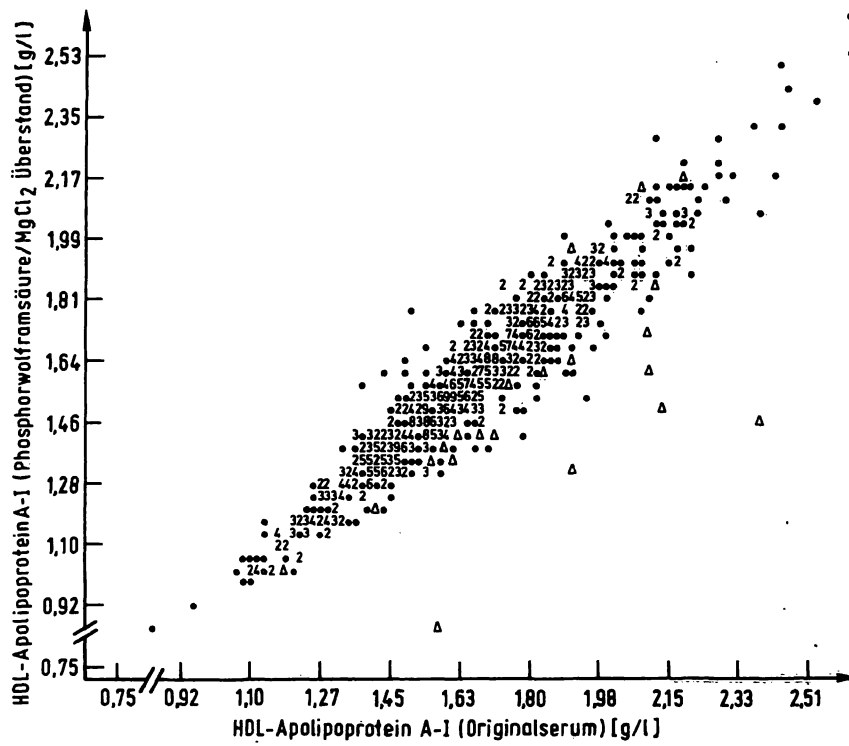


Abb. 1. Korrelation der durch kinetische Nephelometrie erhaltenen Meßdaten von HDL-Apolipoprotein A-I, gemessen im Originalserum und im Überstand nach Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂. Symbole: Δ Seren mit Triglyceridwerten $> 4,56$ mmol/l; \circ Seren mit Triglyceridwerten $< 4,56$ mmol/l; Zahlen: Anzahl der Fälle.

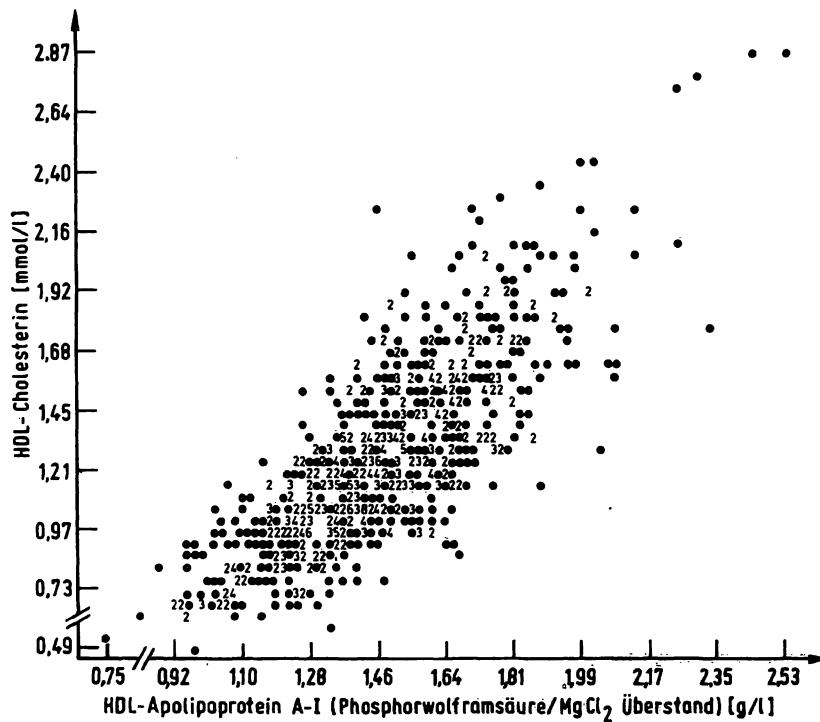


Abb. 2. Korrelation der HDL-Apolipoprotein A-I Konzentration (gemessen mit kinetischer Nephelometrie) und der HDL-Cholesterinkonzentration im Überstand nach Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ aus Normalseren.

Störeinflüsse auf die Phosphorwolframsäurefällung

Die Möglichkeit, HDL-Apolipoprotein A-I mit kinetischer Nephelometrie zu messen, erlaubt Störeinflüsse auf die Wiederfindung von HDL nach Präzipitation Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine zu charakterisieren. Andererseits kann eine inkomplette Fällung von Apolipoprotein B-haltigen Lipoproteinen durch Quantifizierung von Apolipoprotein B überprüft werden.

Einfluß des Triglyceridgehaltes der Proben

Die Fällung mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ wurde nicht durch Triglyceridkonzentrationen bis 4,0 mmol/l beeinflusst. Wir fanden in der $d < 1,21$ kg/l-Fraktion des Fällungsüberstandes nach Phosphorwolframsäure/MgCl₂-Fällung von Proben mit Triglyceridgehalten von 0,57 bis 4,0 mmol/l mit kinetischer Nephelometrie kein Apolipoprotein B (Nachweisgrenze: < 2 mg/dl). Ebenso war in der SDS-Gelelektrophorese der $d < 1,21$ kg/l-Fraktion des Fällungsüberstandes kein Apolipoprotein B nachweisbar. Auch für eine mögliche Mitpräzipitation von HDL bei Fällung lipämischer Seren mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ ergaben sich keinerlei Hinweise. Nach Zugabe von Tracermengen [¹⁴C]HDL oder [¹⁴C]A-I-HDL zu Serumproben mit Triglyceridgehalten von 0,57 bis 4,0 mmol/l wurden unabhängig vom Triglyceridgehalt 90 bis 100% der Radioaktivität im Fällungsüberstand wiedergefunden.

Einfluß des Alters der Proben

Eine 6–9tägige Lagerung von Serumproben bei + 4 °C beeinflusste die Wiederfindung von HDL nach Präzipitation Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine nicht. Es wurden aus gealterten Serumproben annähernd die gleichen HDL-Apolipoprotein A-I-Konzentrationen wie aus frischen Seren ermittelt ($r = 0,95$, $y = 0,99x + 0,55$, $n = 41$).

Einfluß der Reagentienkonzentrationen

Der Einfluß der Reagentienkonzentrationen auf die Mitpräzipitation von HDL wurde durch Zugabe von Tracermengen [¹⁴C]HDL zu frischen Seren überprüft. Bereits geringe Konzentrationsänderungen beider Fällungsreagentien verursachten eine deutliche Erhöhung der Mitpräzipitation von [¹⁴C]HDL (Abb. 3).

Einfluß des pH-Wertes der Reagentien

Bei Mischung des Phosphorwolframsäure- und MgCl₂-Reagenz in den zur Fällung nötigen Endkonzentrationen resultierte ein pH-Wert von pH 6,6. Eine Variation dieses Wertes zwischen pH 6,0 bis pH 7,0 durch Zugabe von HCl oder NaOH ergab keinen meßbaren Einfluß auf die HDL-Apolipoprotein A-I-Konzentration.

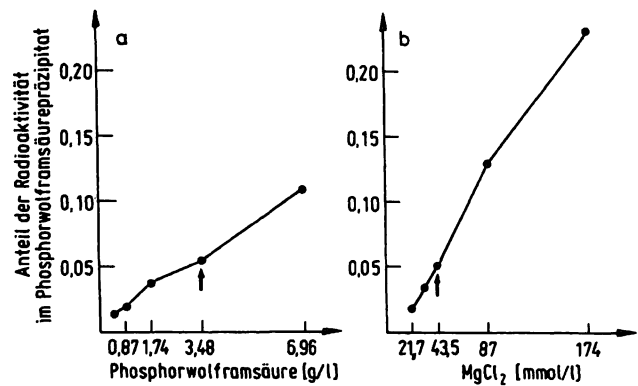


Abb. 3. Kopräzipitation von [¹⁴C]HDL in Abhängigkeit von der Reagenz-Zusammensetzung:

- a) MgCl₂ 43,5 mmol/l, Phosphorwolframsäure-Konzentration variiert;
b) Phosphorwolframsäure 3,48 g/l, MgCl₂-Konzentration variiert.

[¹⁴C]HDL wurde in Tracermengen Normalserum vor der Fällung zugegeben. Pfeile: Normalkonzentration der Reagentien (17).

Diskussion

Routinemethode zur HDL-Cholesterinbestimmung ist die selektive Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine mit Polyanionen oder sulfatierten Polyanionen in Kombination mit divalenten Kationen, mit Detergentien oder mit neutralen Polymeren. Das Fällungsprinzip besteht in der Bildung unlöslicher Komplexe (8, 9). Hierbei bestimmen Art und Konzentration der Fällungsreagentien, pH, Ionenstärke und Protein-zusammensetzung der Probe die Selektivität und Vollständigkeit der Fällung.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist das mit optimaler Reagentienkonzentration durchgeführte Präzipitationsverfahren mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ spezifisch (vollständige Präzipitation Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine, nur geringe Mitpräzipitation von HDL-Apolipoprotein A-I). In Verbindung mit der enzymatischen Cholesterinbestimmung (Cholesterinoxidase/4-Aminophenazon-Phenol-Methode) ergibt das Präzipitationsverfahren ausreichend richtige HDL-Cholesterinanalysen. Die Richtigkeit der HDL-Cholesterinbestimmung wird in hypertriglyceridämischen Seren bis 4,0 mmol/l nicht beeinflusst. Auch bei stärkerer Hypertriglyceridämie wird in der Regel eine komplette Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine sowie eine nahezu vollständige Wiederfindung der HDL beobachtet.

Die HDL sind keine einheitliche Substanz, sondern ein heterogenes Gemisch von Makromolekülen, die sich durch Partikelgröße, chemische Zusammensetzung und physiko-chemische Eigenschaften unterscheiden. Durch unterschiedliche Techniken, wie präparative Ultrazentrifugation, Dichtegradientenzentrifugation oder Ionenaustauscherchromatographie lassen sich verschiedene Subpopulationen der HDL isolieren

(10–13), die ein unterschiedliches Apolipoprotein A-I/Apolipoprotein A-II-Verhältnis (14) bzw. ein unterschiedliches Verhältnis von Cholesterin/Apolipoprotein A-I plus Apolipoprotein A-II aufweisen (15). Diese Heterogenität der HDL erklärt, daß bei der in unseren Untersuchungen durchgeführten Korrelationsanalyse von HDL-Cholesterin und HDL-Apolipoprotein A-I nur ein relativ geringer Korrelationskoeffizient von $r = 0,799$ resultiert.

Es kann vom HDL-Cholesterinwert nicht ohne weiteres auf die HDL-Masse (und umgekehrt) geschlossen werden. Eine wertvolle Ergänzung ist deswegen die gleichzeitige Konzentrationsbestimmung weiterer HDL-Komponenten, wie die der HDL-Apolipoproteine. Bisher vorliegende Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Analytik von HDL-Cholesterin und HDL-Apolipoproteinen durchaus keine identischen Aussagen liefert (16). Während z. B. eine eindeutige negative Beziehung zwischen dem HDL-Cholesterin und dem Schweregrad der häufigsten Risikofaktoren Hypertriglyceridämie, Übergewicht und Hypertonie besteht, ist diese Beziehung zum Apolipoprotein A-I nicht nachweisbar. Andererseits sind bei Rauchern sowohl HDL-Cholesterin als auch Apolipoprotein A-I im Vergleich zur Norm erniedrigt.

Die zur Apolipoprotein-Quantifizierung mittels kinetischer Nephelometrie eingesetzten Antikörper waren spezifisch in Bezug auf HDL-gebundenes Apolipoprotein A-I und zeigten gegenüber freiem Apolipoprotein A-I keine Immunreaktion (unveröffentlicht). Wir bezeichnen die gemessenen Daten als HDL-Apolipoprotein A-I. Vergleicht man die Werte, die mittels kinetischer Nephelometrie für HDL-Apolipoprotein A-I aus Originalserum und aus dem Phosphorwolframsäure/MgCl₂-Überstand gewonnen wurden, findet man letztere im Mittel

um 5% niedriger. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt. Einerseits wäre ein hemmender Einfluß des nach Präzipitation im Überstand verbleibenden Fällungsreagenzes auf die nephelometrisch beobachtete Reaktion zu diskutieren, andererseits ist eine mögliche Kopräzipitation von HDL bzw. Apolipoprotein A-I in Betracht zu ziehen. Neben der falsch negativen Bestimmung aus dem Fällungsüberstand ist alternativ an eine falsch positive nephelometrische Bestimmung aus dem Originalserum zu denken. Experimentell konnte letztere Möglichkeit durch Befunde gestützt werden. In Seren, in denen die triglyceridreichen Lipoproteine künstlich angereichert wurden, nahmen mit zunehmendem Triglyceridgehalt die HDL-Apolipoprotein A-I-Werte deutlich zu (unveröffentlicht). Für diese Annahme spricht ebenfalls, daß Seren mit Triglyceridgehalten $> 4,56$ mmol/l fast immer größere Abweichungen (10–60%) zwischen den im Originalserum und im Phosphorwolframsäure/MgCl₂-Fällungsüberstand gemessenen HDL-Apolipoprotein A-I-Daten aufweisen. Entfernt man die triglyceridreichen Lipoproteine mittels Ultrazentrifugation aus diesen Seren, so erhält man bei anschließender kinetischer nephelometrischer Messung HDL-Apolipoprotein A-I-Werte, die sehr nahe bei den nach Fällung erhaltenen liegen (unveröffentlicht). Aus den vorliegenden Ergebnissen ist zu folgern, daß in hypertriglyceridämischen Seren HDL-Apolipoprotein A-I nephelometrisch nur nach vorheriger Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine bestimmt werden sollte.

Die vorliegende Arbeit wurde mit Mitteln der Fritz-Thyssen-Stiftung und des Bundesministeriums für Forschung und Technologie unterstützt. An der Organisation der epidemiologischen Studien ist das Institut für Arterioskleroseforschung an der Universität Münster beteiligt.

Literatur

1. Assmann, G. (1979), *Internist* 20, 559–564.
2. Assmann, G., Schriewer, H., Schulte, H. & Oberwittler, W. (1980), *Internist* 21, 202–212.
3. Assmann, G. & Schriewer, H. (1980), *Münchener Med. Wschr.* 122, 449–452.
4. Lux, S. E. & John, K. M. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 278, 266–270.
5. Lux, S. E., Levy, R. I., Gotto, A. M. & Fredrickson, D. S. (1972), *J. Clin. Invest.* 51, 2505–2519.
6. Krempler, K., Kostner, G., Bolzano, K. & Sandhofer, F. (1978), *Atherosclerosis* 30, 57–65.
7. Becker, W., Schäfer, W. & Ziegenbein, W. (1980), *Laboratoriumsblätter* 30, 56–65.
8. Cornwell, D. G. & Kruger, F. A. (1961), *J. Lipid. Res.* 2, 110–134.
9. Burstein, M., Scholnick, H. R. & Morfin, R. (1970), *J. Lipid. Res.* 11, 583–595.
10. Mahley, R. W. (1978), Alterations in plasma lipoproteins induced by cholesterol feeding in animals including man. In: *Disturbances in lipid and lipoprotein metabolism* (Dietschy, J. M., Gotto, A. M. Jr. & Ontko, J. A., eds.), American Physiological Society, Bethesda (Maryland) pp 181–197.
11. Anderson, D. W., Nichols, A. V., Forte, T. M. & Lindgren, F. T. (1977), *Biochim. Biophys. Acta* 493, 55–68.
12. Patsch, J. R., Sailer, S., Kostner, G., Sandhofer, F., Holasek, A. & Braunsteiner, H. (1974), *J. Lipid. Res.* 15, 356–366.
13. Rubenstein, B. (1979), *Atherosclerosis* 33, 415–423.
14. Kostner, G. M., Patsch, J. R., Sailer, S., Braunsteiner, H. & Holasek, A. (1974), *Eur. J. Biochem.* 15, 611–621.
15. Cheung, M. C. & Albers, J. J. (1979), *J. Lipid. Res.* 20, 300–307.
16. Assmann, G., Oberwittler, W., Schulte, H., Schriewer, H., Funke, H., Epping, P. H. & Hauss, W. H. (1980), *Internist* 21, 446–459.
17. Assmann, G. & Schriewer, H. (1981), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 1–6.

Prof. Dr. G. Assmann
Zentrallaboratorium
d. Med. Einrichtungen d.
Westf. Wilhelms-Universität
Westring 3
D-4400 Münster