

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

**In vivo Metabolismus von LDL-Subtypen bei Patienten mit koronarer
Herzkrankheit und familiärer Hypercholesterinämie unter
LDL-Apheresetherapie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sabine Carola Bremer

aus

München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. G. Parhofer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. N. Weiss

Prof. Dr. A. K. Walli

Prof. Dr. R. Lorenz

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. H.-C. Geiss

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2006

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
TABELLENVERZEICHNIS	5
1. EINLEITUNG	6
1.1. Bedeutung und Risikofaktoren der Atherosklerose.....	6
1.2. Low Density Lipoproteine (LDL) und LDL-Subtypen.....	6
1.2.1. Definition und Darstellung der LDL-Subtypen.....	6
1.2.2. Bedeutung der LDL-Subtypen im Atherogenesegeschehen.....	7
1.2.3. Einfluss von Diät und Medikamenten auf LDL-Cholesterin und LDL-Subtypen	9
1.2.4. LDL-Apheresetherapie.....	10
1.2.4.1. Indikation und Beschreibung einer LDL-Apherese	10
1.2.4.2. Beschreibung der eingesetzten LDL-Apherese-Verfahren	13
1.2.4.3. Auswirkungen einer LDL-Apherese auf LDL-Cholesterin und LDL-Subtypen/-Verteilung	14
1.3. Metabolismus der LDL-Subtypen	15
1.4. Aufgabe und Fragestellung.....	16
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1. Studiendesign und Patientenkollektiv	21
2.2. Eingesetzte Apherese-Verfahren.....	22
2.3. Gewinnung und Verarbeitung der Proben	22
2.4. Analytische Messung der Lipide	23
2.4.1. Bestimmung der Gesamt-Cholesterin-, Triglyzerid-, HDL- und LDL-Cholesterin-Konzentration	23
2.4.2. Nephelometrische Messung von Apolipoprotein B	23
2.5. Bestimmung der LDL-Subtypen durch Dichtegradientenultrazentrifugation	23
2.5.1. Durchführung der Dichtegradientenultrazentrifugation	24
2.5.1.1. Beschichtung der Ultrazentrifugationsröhrchen	24
2.5.1.2. Herstellung der Salzlösungen.....	25
2.5.1.3. Vorbereitung der Plasmaproben.....	26
2.5.1.4. Erzeugung des Dichtegradienten	26

2.5.1.5. Eigenschaften der Ultrazentrifugation.....	27
2.5.1.6. Fraktionierung der LDL-Subtypen und Erstellung des LDL-Dichteprofiles.....	27
2.5.1.7. Standard	31
2.5.2. Bezugsquellen der Chemikalien und Geräte	32
2.6. Kinetische Modelle	33
2.7. Computerprogramm und Modelling	34
2.8. Berechnung metabolischer Parameter	35
2.9. Statistische Analyse des Wiederanstiegs der LDL-Subtypen	35
3. ERGEBNISSE	36
3.1. LDL-Subtypenprofil vor LDL-Apherese bei Patienten mit FH.....	36
3.2. Effekt der LDL-Apherese auf Lipide bei FH	37
3.2.1. Einfluss auf Plasmalipide.....	37
3.2.2. Auswirkungen auf LDL-Subtypen	39
3.2.3. Verhalten des LDL-Subtypen-Dichteprofiles.....	42
3.3. Wiederanstieg der Lipide nach LDL-Apherese bei FH.....	44
3.4. Wiederanstieg der LDL-Subtypen nach LDL-Apherese	46
3.5. Simulation des Wiederanstiegs von ApoB in den LDL-Subtypen unter Verwendung der Modelle A, B und C	48
3.6. Berechnung des Wiederanstiegs der LDL-Subfraktionen nach Modell C.....	53
3.7. Berechnung der fraktionellen katabolischen Rate (FCR) von LDL-ApoB (nach Modell C)	56
3.8. Berechnung der Produktionsrate (PR) von LDL-ApoB (nach Modell C)	57
4. DISKUSSION	60
4.1. LDL-Subtypen unter Apherese	60
4.2. Bisherige Arbeiten zum LDL-Subtypen-Metabolismus (Tracerstudien)	61
4.2.1. Abhängigkeit des LDL-Subtypen-Metabolismus vom Untersuchungskollektiv.....	62
4.2.2. Vergleich der Ergebnisse von Tracerstudien mit exogen versus endogen markiertem Tracer	63

4.3. Wiederanstiegskinetiken zur Untersuchung des LDL-Subtypen-Stoffwechsels	64
4.3.1. Rebound-Modelle als Nicht-Tracer-Methode	64
4.3.2. Ergebnisse der angewandten Methode bezogen auf existierende Tracerstudien.....	65
4.3.3. Weiterführende Turnoverstudie zu Modell C	66
4.4. Berechnete metabolische Parameter (nach Modell C)	66
4.4.1. Vergleich der FCR zwischen den Studien	66
4.4.2. Interpretation der errechneten PR	68
4.5. Limitationen der Studie (Störfaktoren, Fehlermöglichkeiten und Voraussetzungen)	68
4.5.1. Begleitmedikation mit Statinen	69
4.5.2. Prämissen.....	70
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	72
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	77
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	90
8. DANKSAGUNG	92
9. LEBENSLAUF	93

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1a: Vollblut-LDL-Apherese (DALI)	12
Abbildung 1b: HELP-Apherese.....	12
Abbildung 1c: Weitere LDL-Aphereseverfahren	13
Abbildung 2: Modell A.....	18
Abbildung 3: Modell B.....	19
Abbildung 4: Modell C	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung der DGUZ.....	26
Abbildung 6a: LDL-Cholesterinprofil	30
Abbildung 6b: Dichtereferenzkurve.....	30
Abbildung 6c: LDL-Subtypen-Dichteprofil.....	31
Abbildung 8: LDL-Subtypen vor Apherese	36
Abbildung 9: LDL-Subtypen bei FH im Vergleich zu NLP.....	37
Abbildung 10: Veränd. des LDL-Subtypenprofils über 7 Tage (Chol).....	43
Abbildung 11: Veränd. des LDL-Subtypenprofils über 7 Tage (ApoB).....	44
Abbildung 12: Wiederanstieg von Cholesterin, LDL- und HDL-Cholesterin sowie von ApoB nach LDL-Apherese	45
Abbildung 13: Wiederanstiegsverhalten der einzelnen LDL-Subtypen	46
Abbildung 14: Wiederanstieg (%) der LDL-Subtypen n. LDL-Apherese ...	48
Abbildung 15a: Simulation des Wiederanstiegs von ApoB unter Verwendung von Modell A (Patient S.P.)	49
Abbildung 15b: Simulation des Wiederanstiegs von ApoB unter Verwendung von Modell B (Patient S.P.)	49
Abbildung 15c: Simulation des Wiederanstiegs von ApoB unter Verwendung von Modell C (Patient S.P.)	50
Abbildung 16a: Simulation des Wiederanstiegs von ApoB unter Verwendung von Modell A (Patient F.E.).....	50
Abbildung 16b: Simulation des Wiederanstiegs von ApoB unter Verwendung von Modell B (Patient F.E.).....	51
Abbildung 16c: Simulation des Wiederanstiegs von ApoB unter Verwendung von Modell C (Patient F.E.)	51
Abbildung 17a: Wiederanstieg nach Modell C (Patient A.W.).....	54
Abbildung 17b: Wiederanstieg nach Modell C (Patient K.K.).....	54
Abbildung 17c: Wiederanstieg nach Modell C (Patient L.B.)	55
Abbildung 17d: Wiederanstieg nach Modell C (Patient S.G.)	55
Abbildung 17e: Wiederanstieg nach Modell C (Patient S.K.).....	56

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Dichtebereich der sieben LDL-Subfraktionen	29
Tabelle 2: Mittlere Dichte d. einzelnen LDL-Fraktionen	32
Tabelle 3a: Lipoproteinkonzentrationen vor und direkt nach LDL-Apherese sowie vor der nächst folgenden Apherese.....	38
Tabelle 3b: Lipoproteinkonzentrationen der einzelnen Patienten vor sowie direkt nach LDL-Apherese.....	39
Tabelle 4a: Wiederanstieg von Cholesterin und ApoB in large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL nach LDL-Apherese.....	40
Tabelle 4b: ApoB der jeweiligen Patienten in den large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL-Subfraktionen vor und nach Apherese.....	41
Tabelle 5: Vergleich der Modelle in Bezug auf das Akaike Information Criterion (AIC).....	52
Tabelle 6: FCR von large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL-ApoB.....	57
Tabelle 7: PR von large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL-ApoB.....	58
Tabelle 8: Produktion der small-dense LDL-Subtypen von ApoB nach Modell C.....	59
Tabelle 9: Überblick über Studien zum LDL-Subtypen-Metabolismus.....	61

1. EINLEITUNG

1.1. Bedeutung und Risikofaktoren der Atherosklerose

In den westlichen Industrienationen stellen atherosklerotische Folgeerkrankungen immer noch die häufigste Todesursache dar. Das Ausmaß und die Entwicklung einer Atherosklerose sind hierbei eng mit dem Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren (RF) verknüpft. Als Hauptrisikofaktoren, deren Bedeutung im Atherogenese geschehen durch zahlreiche epidemiologische Untersuchungen [4, 6, 14] sowie durch Interventionsstudien [12, 14, 45, 87] gesichert ist, gelten dabei: arterieller Hypertonus, Rauchen, erhöhtes LDL-Cholesterin („Low Density Lipoprotein“-Cholesterin), niedriges HDL-Cholesterin („High Density Lipoprotein“-Cholesterin), Diabetes mellitus und positive Familienanamnese [59].

Zu den weiteren kardiovaskulären RF zählen Hypertriglyzeridämie, Adipositas, körperliche Inaktivität, erhöhtes Lipoprotein(a), Homocystein, Fibrinogen sowie CRP (C-reaktives Protein).

1.2. Low Density Lipoproteine (LDL) und LDL-Subtypen

1.2.1. Definition und Darstellung der LDL-Subtypen

In der vorliegenden Arbeit soll der Focus auf die atherogenen Lipoproteine niedriger Dichte gelenkt werden, die auch unter dem Begriff „Low Density Lipoproteine“ oder kurz „LDL“ bekannt sind. Hierbei handelt es sich nicht um eine homogene, sondern um eine heterogene Gruppe von Lipoproteinen, die sich in Größe und Dichte voneinander unterscheiden [18, 26, 49, 76, 86]. Dabei besteht ein enger, inverser Zusammenhang zwischen Größe und Dichte der Partikel, so dass zum einen große LDL-

Subtypen geringer Dichte, die als „large-buoyant LDL“ bezeichnet werden, von den LDL-Subtypen intermediärer Größe und Dichte, auch „intermediate-dense LDL“ genannt, und andererseits von den kleinen LDL-Subtypen mit hoher Dichte, den „small-dense“ LDL, unterschieden werden. Zur Auftrennung der Low Density Lipoproteine in die einzelnen LDL-Subtypen können dabei zwei unterschiedliche Verfahren eingesetzt werden [5]: Wird die Dichte der LDL-Partikel als Trennkriterium herangezogen, so können die einzelnen LDL-Subtypen durch Dichtegradientenultrazentrifugation (DGUZ) aufgetrennt werden [17, 18, 36, 39, 48]. Verwendet man dagegen die Größe der Partikel als Anhaltspunkt, so kann hierfür die Gradientengelelektrophorese (GGE) eingesetzt werden [22, 49, 56, 60].

1.2.2. Bedeutung der LDL-Subtypen im Atherogenese geschehen

Wie bereits unter 1.1. erläutert, stellt eine erhöhte LDL-Cholesterinkonzentration einen unabhängigen Risikofaktor für das Entstehen und die Progredienz einer koronaren Herzkrankheit (KHK) dar [25]. Es konnte gezeigt werden, dass durch Absenkung der LDL-Cholesterinkonzentration die Anzahl an Neuerkrankungen einer KHK reduziert werden (Primärprävention) und bei bereits vorliegender KHK durch LDL-Reduktion deren Fortschreiten und das Auftreten weiterer Ereignisse verhindert werden kann (Sekundärprävention) [12, 45, 87].

Epidemiologische Studien [4, 6, 14, 37, 51, 85, 88] und in-vitro Experimente [52, 61, 84] haben zudem ergeben, dass large-buoyant LDL [14] und insbesondere small-dense LDL [4, 6, 37, 51, 85, 88] eine größere atherogene Rolle spielen als intermediate-dense LDL. Für diese

Beobachtungen lassen sich mehrere Erklärungen finden. Zum einen ist das Auftreten von small-dense LDL mit erhöhten Triglyzeridkonzentrationen und erniedrigten HDL-Cholesterin-Werten im Plasma vergesellschaftet [4, 6, 79]. Diese Lipidkonstellation wird auch als atherogenes Lipoproteinprofil oder atherogener Lipoproteinphänotyp bezeichnet. Desweiteren zeigen small-dense LDL eine geringere Bindungsaffinität zum LDL-Rezeptor [13, 53, 61] als weniger dichte LDL-Partikel. Damit könnte das unterschiedliche Bindungsverhalten auch die gelegentlich beobachtete geringere Katabolismusrate der small-dense LDL gegenüber den intermediate-dense und large-buoyant LDL erklären. Daneben sind small-dense LDL auch modifikations- und oxidationsanfälliger [44, 57, 84]. Small-dense LDL weisen eine stärkere Oxidationsbereitschaft [20] durch einen geringeren Anteil an Antioxidantien auf [21, 42], wodurch auch eine größere Adhärenz an intimale Proteoglykane hervorgerufen wird [2, 52].

Allerdings gibt es widersprüchliche Erkenntnisse darüber, ob small-dense LDL einen unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor darstellen. Diesbezüglich kamen einige Studien zu dem Ergebnis, dass small-dense LDL nur in Zusammenhang mit erhöhten Triglyzeridwerten und erniedrigtem HDL-Cholesterin im Plasma ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer KHK mit sich bringen [6, 19, 38, 77, 79]. Andere Studien konnten jedoch zeigen, dass small-dense LDL nicht nur unabhängig von Alter, Body Mass Index, Rauchen und der Therapie mit β -Blockern ein erhöhtes Atherosklerose-Risiko beinhalten, sondern auch unabhängig von der Triglyzerid- und HDL-Cholesterin-Konzentration einen eigenständigen

Risikofaktor im Bezug auf die Ausbildung einer KHK darstellen [4, 30, 37, 51, 68, 78, 81].

1.2.3. Einfluss von Diät und Medikamenten auf LDL-Cholesterin und LDL-Subtypen

Zur Senkung des LDL-Cholesterins bei Hyperlipoproteinämien sowie zur Prävention einer koronaren Herzkrankheit (KHK) stehen mehrere Therapiemöglichkeiten (diätetische Maßnahmen, lipidsenkende Medikamente) zur Verfügung.

Dabei sollte als erste therapeutische Maßnahme, um den LDL-Cholesterinwert abzusenken, bei Übergewicht eine Gewichtsreduktion durch eine fettmodifizierte und cholesterinreduzierte Diät sowie durch ausreichende körperliche Aktivität erzielt werden. Diese beiden Maßnahmen führen nicht nur zu einer Senkung des Gesamt-LDL-Cholesterins [23], sondern beeinflussen auch das LDL-Subtypen-Dichteprofil positiv, da es hierdurch besonders zu einer Absenkung der small-dense LDL kommt [40, 41, 89, 90, 92]. Dies lässt sich durch den bereits dargestellten engen Zusammenhang zwischen häufig vergesellschaftetem Vorliegen von Hypertriglyzeridämie, niedrigem HDL und hohem small-dense LDL erklären [4, 6, 79], weshalb sich Lebensstilmaßnahmen zur Absenkung von erhöhten Triglyzeridwerten auch besonders effektiv auf die Normalisierung bzw. Verbesserung des LDL-Subtypenmusters auswirken.

Auf der nächsten Therapiestufe kommen verschiedene lipidsenkende Medikamente (wie HMG-Co-A-Reduktasehemmer = Statine, Fibrate oder Nikotinsäure) zum Einsatz, die durch unterschiedliche Wirkungsmechanismen das LDL-Cholesterin absenken, und teilweise

zusätzlich das LDL-Subtypenprofil positiv verändern können. So konnte bei Patienten mit kombinierter Hyperlipoproteinämie unter Therapie mit Fibraten eine Normalisierung der Triglyzeridkonzentration erreicht und das LDL-Profil im Sinne einer Verminderung von small-dense LDL günstig beeinflusst werden [11, 29, 47, 72]. Analoge Beobachtungen wurden bei Verabreichung von Nikotinsäurepräparaten gemacht [44, 55, 58]. Statine, die vor allem LDL-Cholesterin senken, wirken sich im Falle von Simvastatin und Atorvastatin auf alle LDL-Subtypen aus. Das Cholesterin wird von ihnen ausnahmslos in allen LDL-Subfraktionen abgesenkt, das Ausmaß der small-dense LDL-Absenkung variiert dabei je nach zugrundeliegender Stoffwechselstörung [11, 32, 47]. Für Fluvastatin konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass es small-dense LDL besonders stark absenken kann [54, 91]. Allerdings handelte es sich hierbei um eine selektionierte Patientengruppe (small-dense LDL > 25 mg/dl).

1.2.4. LDL-Apheresetherapie

1.2.4.1. Indikation und Beschreibung einer LDL-Apherese

Wenn bei Patienten mit KHK die unter 1.2.3. beschriebenen Behandlungsarten nicht zu einer ausreichenden LDL-Cholesterin-Senkung führen, stellt die LDL-Apherese eine weitere Therapieform zur Behandlung der LDL-Hypercholesterinämie dar.

Die Indikation zur LDL-Apherese besteht somit für Patienten mit KHK, wenn trotz maximal ausgeschöpfter diätetischer und medikamentöser Therapie keine LDL-Cholesterin-Konzentration unter 100 mg/dl erreicht wird [9, 46]. Zu dieser Patientengruppe zählen vorzugsweise Patienten mit schwerer LDL-Hypercholesterinämie - beispielsweise im Rahmen einer

heterozygoten familiären Hypercholesterinämie (FH) - und solche, die keine LDL-senkenden Medikamente, insbesondere Statine, vertragen [35, 70, 82]. Bei Vorliegen einer homozygoten FH, die mit sehr hohen LDL-Cholesterin-Spiegeln einhergeht, ist eine LDL-Apherese bereits als primärpräventive Maßnahme indiziert [82].

Bei der LDL-Apherese handelt es sich um ein Verfahren, bei dem LDL-Partikel sowie Lipoprotein(a) unter Verwendung eines extrakorporalen Blutkreislaufes mit Hilfe verschiedener physikochemischer Methoden entfernt werden. Hierbei können LDL-Partikel zum einen direkt aus dem Vollblut eliminiert werden (= DALI-Verfahren = direct adsorption of lipids, siehe Abb. 1a und 1.2.4.2.), zum anderen gibt es mehrere Verfahren, die LDL-Partikel aus dem Plasma entfernen können. Zur Plasmaseparation können wiederum ein Filter oder eine Zentrifuge verwendet werden. Als Eliminationsverfahren stehen die HELP-Apherese (siehe Abb. 1b), die Dextransulfatadsorption sowie die Immunoabsorption und die Membrandifferentialfiltration (= MDF) zur Verfügung (siehe Abb. 1c und 1.2.4.2.).

Abbildung 1a: Vollblut-LDL-Apherese (DALI)

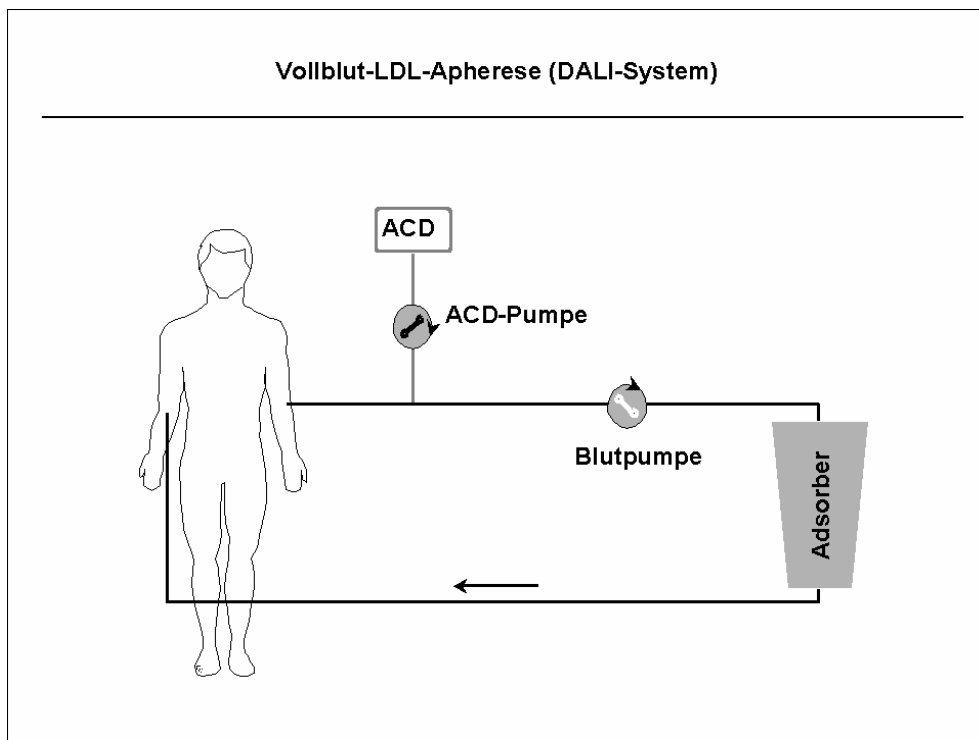


Abbildung 1b: HELP-Apherese

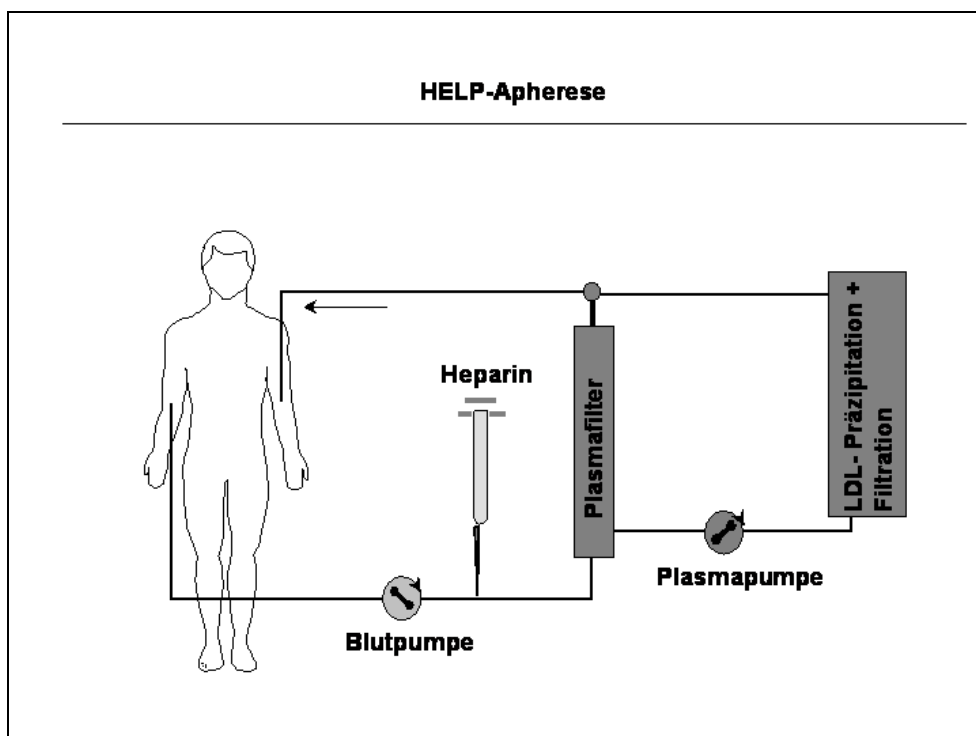
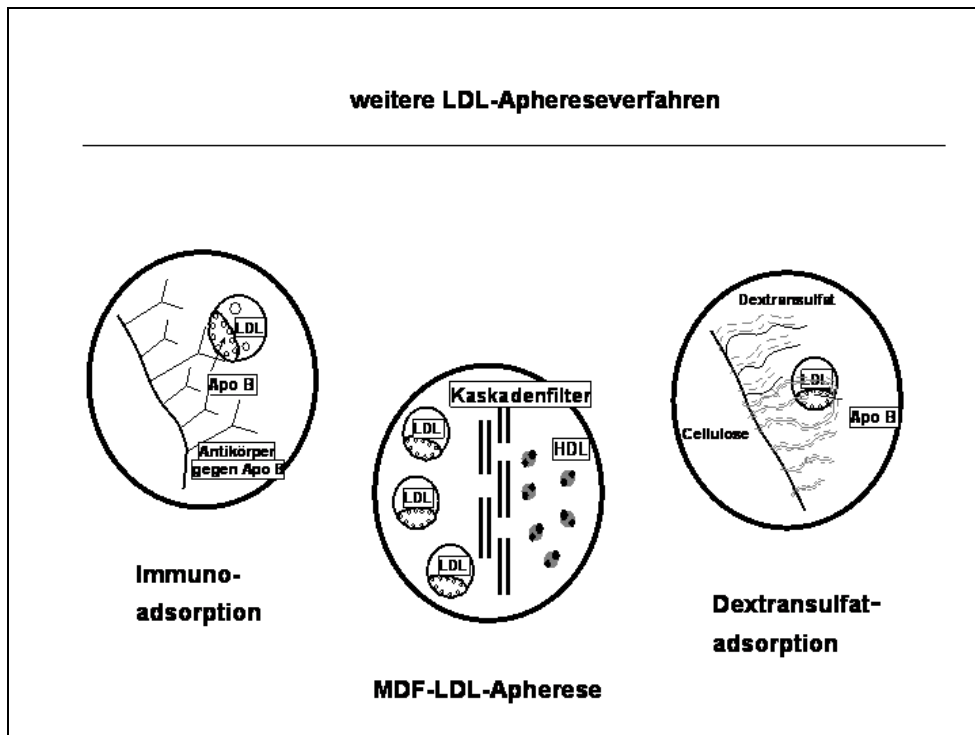


Abbildung 1c: weitere LDL-Aphereseverfahren



1.2.4.2. Beschreibung der eingesetzten LDL-Apherese-Verfahren

Die Heparin-induzierte Extrakorporale LDL-Präzipitation (HELP) basiert auf dem Prinzip, dass bei hoher Heparinkonzentration und bei saurem pH LDL, Lp(a) und Fibrinogen präzipitieren (Abb. 1b). Die so entstandenen Heparin-LDL-Fibrinogen-Präzipitate werden durch einen Polycarbonatfilter vom Plasma getrennt. Dann wird das Heparin über einen Adsorber eliminiert und der pH wird durch eine Bicarbonatdialyse wieder in den physiologischen Bereich angehoben, bevor das gereinigte Blutplasma wieder den Körper erreicht [75].

Ein anderes LDL-Apherese-Verfahren ist die Dextransulfatadsorption, bei dem Blutplasma durch Filtration gewonnen und über eine Säule geleitet wird, auf der sich an Zellulose gebundenes niedermolekulares

Dextransulfat befindet (Abb. 1c, rechts). Bei diesem Vorgang bindet LDL und Lipoprotein(a) an die Säule, da die positiv geladenen Apolipoprotein-B-Partikel von dem negativ geladenen Dextransulfat angezogen werden [34].

Beim Verfahren der Immunoabsorption wird das Blutplasma in eine Glassäule gepumpt, die mit Sepharosegel mit polyklonalen Antikörpern gegen ApoB gefüllt ist (Abb. 1c, links). Durch die Antigen-Antikörper-Reaktion werden die LDL- und Lp(a)-Partikel dort gebunden und das gereinigte Plasma wird dem Körper wieder zusammen mit den Blutzellen zugeführt [71].

Bei der LDL-Hämoperfusion mit dem DALI-System (direkte Adsorption von Lipoproteinen) werden die LDL-Partikel direkt aus dem Vollblut an die innere Oberfläche von Polyacrylamidkügelchen, die wiederum mit Polyacrylacetat beschichtet sind, geheftet (Abb. 1a) [8, 10].

1.2.4.3. Auswirkungen einer LDL-Apherese auf LDL-Cholesterin und LDL-Subtypen/-Verteilung

Durch die Behandlung mit einer LDL-Apherese wird eine Senkung des Gesamt-LDL-Cholesterins von durchschnittlich 60% erzielt. In den darauffolgenden Tagen nach Apherese steigt die LDL-Cholesterinkonzentration wieder bis zu ihrem Ausgangswert an. Durch regelmäßige LDL-Apheresetherapie kann die LDL-Cholesterinkonzentration effektiv abgesenkt und das weitere Fortschreiten einer KHK aufgehalten werden [50]. Es konnte gezeigt werden, dass mit dieser Therapiemethode alle LDL-Subtypen unabhängig vom durchgeführten Verfahren aus dem Plasma entfernt werden [62, 74]. Darüber hinaus war eine besonders gute

Elimination von small-dense LDL auffällig, die zu einer Verschiebung (= Shift) im LDL-Subtypen-Dichteprofil führte. Die Verteilung der LDL-Subtypen änderte sich durch einen relativen Anstieg der large-buoyant LDL und eine relative Abnahme der small-dense LDL sofort nach Apheresebehandlung. Als wahrscheinlichste Erklärung für diese Verschiebung im LDL-Subtypen-Profil kommt ein unterschiedlich schnelles Wiederanstiegsverhalten der einzelnen LDL-Subtypen während und nach LDL-Apherese in Frage [62].

1.3. Metabolismus der LDL-Subtypen

Der Metabolismus der LDL-Subtypen und insbesondere die Bildung der atherogenen small-dense LDL sind noch nicht völlig geklärt. Es gibt hierzu wenige Studien mit radioaktiven Tracern, die darauf hindeuten, dass möglicherweise verschiedene Stoffwechselwege existieren [1, 15, 27, 31, 63, 80, 83]. Die Studie von Campos et al. beschreibt, dass small-dense LDL direkt aus Vorläuferpartikeln, z.B. den Lipoproteinen mit sehr geringer Dichte (VLDL) und denen mit intermediärer Dichte (IDL), gebildet werden [15]. Im Gegensatz dazu weisen Daten von Aguilar-Salinas darauf hin, dass small-dense LDL vorzugsweise durch Delipidierung wenig dichter LDL-Subtypen (large-buoyant LDL, intermediate-dense LDL) entstehen [1]. Andere Studien zeigen jedoch wiederum, dass die Bildung von small-dense LDL aus der Kombination beider Stoffwechselwege erklärt werden kann [27, 80, 83].

1.4. Aufgabe und Fragestellung

Da der exakte Metabolismus der LDL-Subtypen noch nicht komplett verstanden ist und im speziellen über die Bildung der small-dense LDL teilweise widersprüchliche Ergebnisse aus den Tracerstudien vorliegen (siehe 1.3.), sollte in der vorliegenden Arbeit der LDL-Subtypen-Metabolismus mit einer Nicht-Tracer-Methode untersucht werden:

Im Rahmen der Studie sollten aus der Analyse des Wiederanstiegverhaltens (Rebound) der LDL-Subtypen nach einer LDL-Apherese über 7 Tage hinweg Rückschlüsse auf deren Metabolismus gezogen werden.

Diese Nicht-Tracer-Methode basiert auf dem Konzept, dass sich im „steady-state“ befindliche Metabolite (z.B. LDL-Subtypen), deren Konzentrationen durch eine definierte Störung verändert werden - wie geradezu beispielhaft durch eine LDL-Apherese - ihr Steady State anschließend wieder mit einer Dynamik und Geschwindigkeit erreichen, die nur von der fraktionellen katabolischen Rate (FCR, siehe 2.8.) des jeweiligen Metaboliten abhängt [3, 24, 66, 67]. Somit können mit dieser Methode durch die Analyse des Wiederanstiegsverhaltens der einzelnen LDL-Subtypen deren metabolische Parameter abgeleitet werden (z.B. die FCR). Wesentliche Voraussetzung für diese Methode ist jedoch die Annahme, dass die Sekretionsrate der untersuchten Metabolite (LDL-Subtypen) durch die definierte Störung (z.B. LDL-Apherese) ihrerseits nicht verändert wird [64].

Zur Beschreibung der LDL-Subtypen und ihres Wiederanstiegs nach LDL-Apherese sowie zur Abschätzung ihrer metabolischen Parameter muss der ApoB-Gehalt im jeweiligen LDL-Subtyp durch serielle

Konzentrationsmessungen bestimmt werden. Dies ist ein besserer Parameter als Cholesterin für die Anzahl der LDL-Partikel, da diese unabhängig von Größe bzw. Dichte jeweils ein ApoB-Molekül enthalten.

Um zu dokumentieren, dass sich die Zusammensetzung der Lipoproteine in den einzelnen LDL-Subfraktionen durch die Apherese nicht ändert, wurden zusätzlich die Cholesterinkonzentrationen in den einzelnen LDL-Subtypen gemessen. Ein weiteres Ziel ist also die Beschreibung des Verhaltens einzelner Komponenten der LDL-Subfraktionen nach Apherese. Da aus den oben diskutierten Tracerstudien (siehe 1.3.) aber auch ableitbar ist, dass die zugrundeliegende Hyperlipoproteinämie die Bildungswege der small-dense LDL beeinflussen kann, soll ein definiertes Kollektiv untersucht werden: es werden daher ausschließlich Patienten mit KHK und Familiärer Hypercholesterinämie (FH), die regelmäßig mit LDL-Apherese behandelt werden, in die Studie aufgenommen. Bei jedem Patienten soll der Wiederanstieg (= Rebound) der LDL-Subtypen nach Durchführung einer LDL-Apherese bestimmt werden. Die gemessenen Wiederanstiegsdaten sollen dann dahingehend analysiert werden, wie gut sie mit simulierten Wiederanstiegskinetiken übereinstimmen. Für diese Simulationen wird ein Computerprogramm verwendet und es sollen für drei verschiedene hypothetische Modelle (Modelle A-C), nach denen es denkbar ist, dass small-dense LDL gebildet werden, Simulationen durchgeführt werden:

- Modell A postuliert dabei eine indirekte Produktion von small-dense LDL durch Delipidierung weniger dichter LDL-Subtypen (large-buoyant LDL, intermediate-dense LDL, siehe Abb. 2).

- Modell B geht von einer direkten und voneinander unabhängigen Bildung von large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL aus VLDL/IDL-Vorläuferpartikeln aus (siehe Abb. 3).

- Modell C beinhaltet die Kombination dieser beiden Stoffwechselwege für die Bildung von small-dense LDL (siehe Abb. 4).

Abbildung 2: Modell A

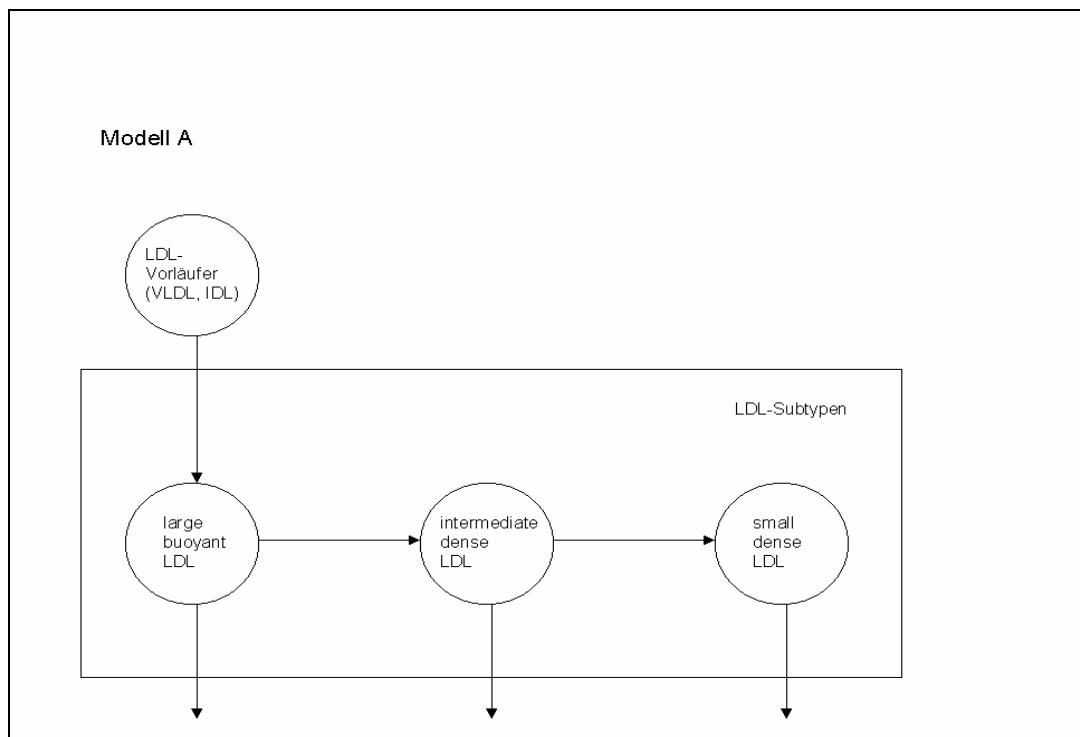


Abbildung 3: Modell B

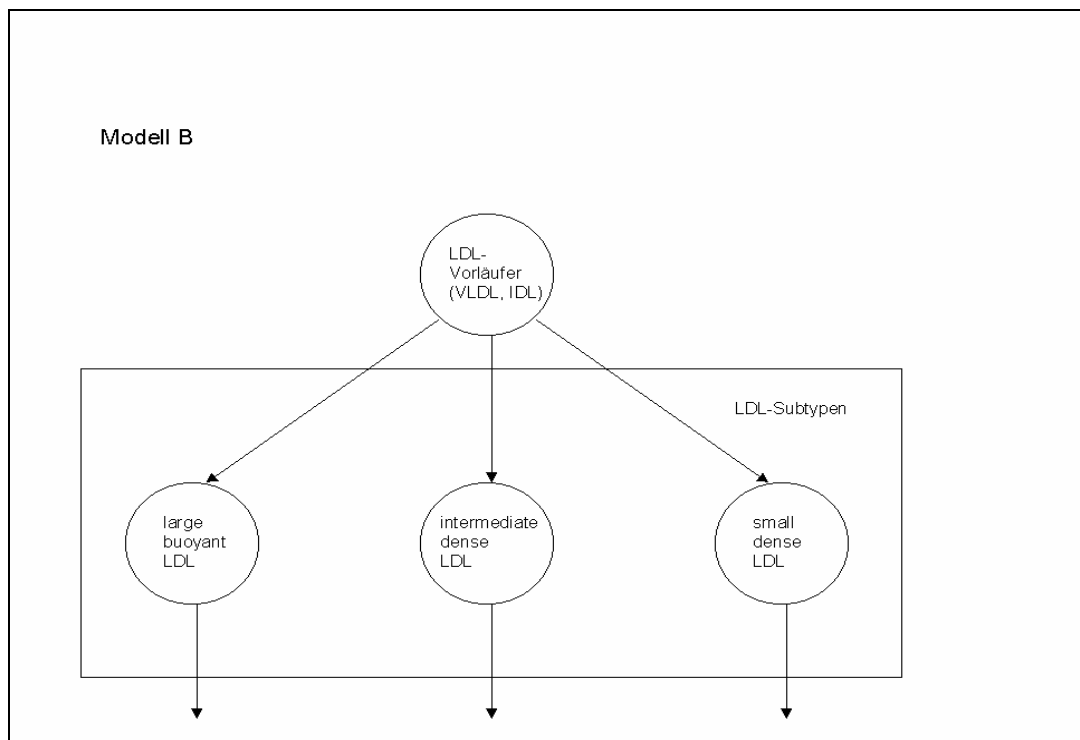
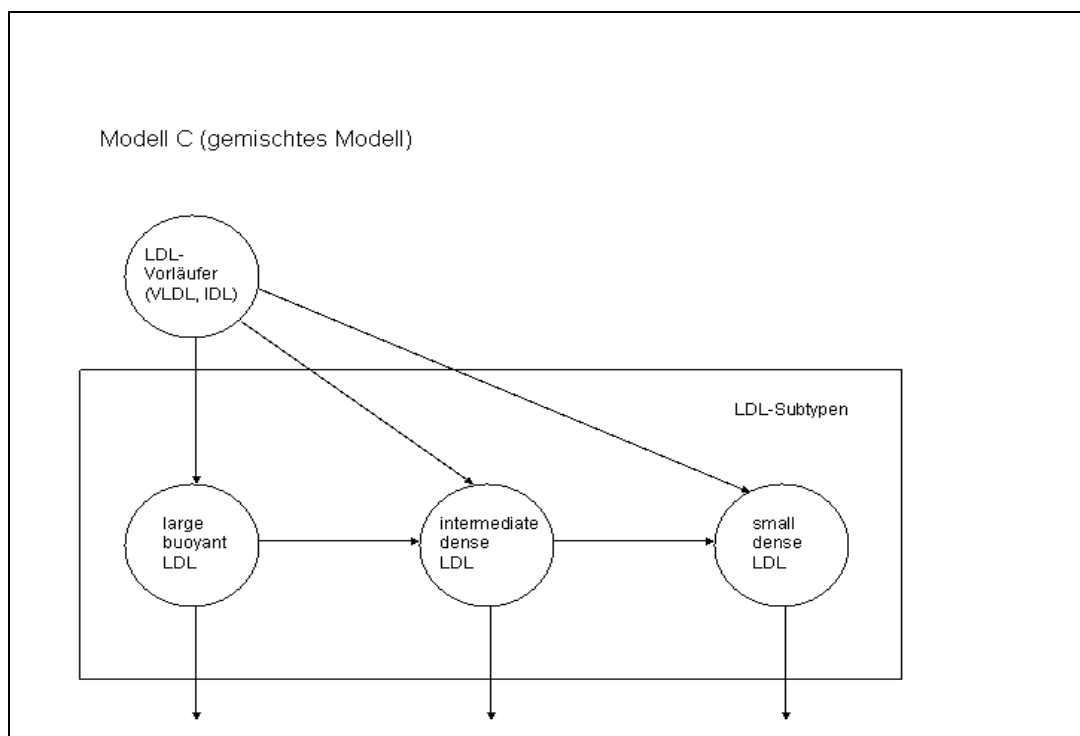


Abbildung 4: Modell C



Das Modell mit der besten Übereinstimmung der beobachteten mit den simulierten Daten soll dann verwendet werden, um die metabolischen Parameter wie die fraktionelle katabolische Rate (FCR, siehe 2.8.) und die Produktionsrate (PR, siehe 2.8.) für die large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL-Subtypen abzuschätzen.

Weiterhin soll getestet werden, in wieweit die metabolischen Parameter, welche aus demjenigen Modell abgeleitet werden, das die beobachteten Daten am besten beschreibt (Modell A, B oder C), mit publizierten Daten zum LDL-Stoffwechsel übereinstimmen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Studiendesign und Patientenkollektiv

Es wurden sieben Patienten untersucht, die alle an einer angiographisch dokumentierten koronaren Herzkrankheit (KHK) und einer familiären Hypercholesterinämie (FH) leiden (Alter: 58 ± 9 Jahre, 4 Männer, 3 Frauen, Prä-Apherese-Konzentrationen: Gesamt-Cholesterin 408 ± 102 mg/dl, LDL-Cholesterin 342 ± 87 mg/dl, Triglyzeride 109 ± 39 mg/dl, HDL-Cholesterin 46 ± 12 mg/dl). Alle Patienten wurden regelmäßig seit mindestens zwei Jahren in ein- oder zweiwöchigen Intervallen mit einer LDL-Apherese-Therapie behandelt. Weiterhin hielten alle Patienten eine cholesterinarme und fettmodifizierte Diät ein. Sechs Patienten wurden zusätzlich seit mindestens sechs Monaten mit einem Statin behandelt, dessen Dosierung sich nach der individuell maximal tolerierbaren Dosis richtete (Atorvastatin: $n = 5$, Simvastatin: $n = 1$).

Bei allen Studienteilnehmern wurden Mutationen von ApoB ausgeschlossen und die Diagnose einer heterozygoten FH wurde anhand von klinischen Kriterien gestellt.

Der Wiederanstieg der 7 LDL-Subtypen wurde anhand von 6 Messungen nach Apherese bestimmt. Somit wurden die Cholesterin- und ApoB-Konzentrationen in allen 7 LDL-Subfraktionen sofort nach Apherese (Tag 0) und an den Tagen 1, 2, 3, 5 und 7 nach erfolgter Apherese gemessen.

Alle Patienten wurden in einem persönlichen Gespräch ausführlich über die geplante Studie informiert und erteilten anschließend ihr schriftliches Einverständnis. Auch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München, hat dem Studienprotokoll zugestimmt.

2.2. Eingesetzte Apherese-Verfahren

Als LDL-Apherese-Verfahren wurde bei einem Patienten die Immunoabsorption (Plasmaselect, Teterow, Deutschland), bei zwei Patienten die HELP-Methode (Braun, Melsungen, Deutschland), bei zwei weiteren Patienten die Dextransulfatadsorption (Kaneka, Osaka, Japan) [69] und bei den beiden restlichen Patienten die LDL-Hämoperfusion mit dem DALI-System (Fresenius, St. Wendel, Deutschland) [10] angewendet. Die Patienten, die mit HELP, Dextransulfatadsorption oder Immunoabsorption behandelt wurden, erhielten eine Antikoagulation mit Heparin (1000 - 5500 IU als Bolus und bis zu 3000 IU/h kontinuierlich), während den Patienten, die mit dem DALI-System therapiert wurden, eine Citrat-Dextrose-Lösung - wie empfohlen [10] - verabreicht wurde. Die Apheresedauer wurde dahingehend standardisiert, dass (mit Zwischenmessung des Gesamt-Cholesterins) eine Postapherese-LDL-Konzentration von 50 - 60 mg/dl erreicht wurde. Hierfür wurde eine Behandlungszeit von 1.15 - 3.20 h und ein Plasmavolumen (gesamtes Blutvolumen) von 2500 - 6000 ml (5200 - 8500 ml) benötigt.

2.3. Gewinnung und Verarbeitung der Proben

Den Patienten wurde unmittelbar vor und nach Apherese sowie an den Tagen 1, 2, 3, 5 und 7 nach Apherese jeweils morgens und in nüchternem Zustand 2 x 10 ml Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen. Die so gewonnenen Blutproben wurden bei 3000 Umdrehungen/min für jeweils 10 Minuten zentrifugiert und das anschließend abgehobene Plasma wurde bei 4°C aufbewahrt. Die Lipidmessungen daraus erfolgten innerhalb von 48

Stunden. Die Plasmaproben für die LDL-Subtypen-Bestimmungen wurden bis zur Durchführung der DGUZ bei -75°C eingefroren .

2.4. Analytische Messung der Lipide

2.4.1. Bestimmung der Gesamt-Cholesterin-, Triglyzerid-, HDL- und LDL-Cholesterin-Konzentration

Die Gesamt-Cholesterin- und Triglyzerid-Konzentrationen im Plasma wurden mit enzymatischen Verfahren anhand eines Autoanalyzers (EPOS, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Das HDL-Cholesterin wurde nach Fällung der Apolipoprotein B (ApoB) enthaltenden Partikel mit Dextransulfat und Magnesiumazetat gemessen. Der LDL-Cholesterinwert wurde nach der Formel von Friedewald berechnet [28], da alle Plasma-Triglyzeridkonzentrationen unter 400 mg/dl lagen:

$$\text{LDL-Chol} = \text{Gesamt-Chol} - \text{HDL-Chol} - (\text{Triglyzeride}/5)$$

2.4.2. Nephelometrische Messung von Apolipoprotein B

Die Konzentration von Apolipoprotein B wurde immunnephelometrisch anhand von Kaninchen-Antikörpern gegen humanes ApoB bestimmt (Behring Nephelometer 100 Analyzer, DADE Behring, Marburg; N-Antiserum Human Apolipoprotein B vom Kaninchen, Behring;).

2.5. Bestimmung der LDL-Subtypen durch Dichtegradientenultrazentrifugation

Der Dichtegradientenultrazentrifugation liegt die unterschiedliche Wanderung von aufzutrennenden Partikeln im Zentrifugalfeld zugrunde, die von Eigenschaften wie Durchmesser und Dichte der Teilchen und von

Eigenschaften der Zentrifugationslösung wie Viskosität und Dichte sowie dem Gravitationsfeld abhängt.

Mit diesem Verfahren können LDL-Partikel, je nach Modifikation der Methode, in unterschiedlich viele LDL-Subfraktionen aufgetrennt werden.

2.5.1. Durchführung der Dichtegradientenultrazentrifugation

Die LDL-Subtypen wurden mittels isopyknischer Dichtegradientenultrazentrifugation nach der Methode von Chapman et al. [17] mit einigen Abwandlungen, die kürzlich von Schamberger et al. [74] beschrieben wurden, aufgetrennt. Hierbei werden im LDL-Dichtebereich von 1.019 - 1.063 g/ml sieben verschiedene LDL-Subfraktionen voneinander isoliert. Die einzelnen Arbeitsschritte werden im Folgenden genauer beschrieben.

2.5.1.1. Beschichtung der Ultrazentrifugationsröhrchen

Für die DGUZ kamen Zentrifugationsröhrchen mit einer speziellen Beschichtung zur Anwendung, die folgendermaßen hergestellt wurden: Für die Beschichtungslösung wurden 6 g Polyvinylalkohol in 150 ml H₂O bidest unter Rückfluss erhitzt und gerührt. Hierzu wurde über einen Tropftrichter 150 ml Isopropanol zugefügt. Die Lösung wurde anschließend solange gerührt und erhitzt, bis die Alkohole vollständig reagierten. Dies war an einem Aufklaren der Lösung zu erkennen. Danach ließ man die Beschichtungslösung auf Raumtemperatur abkühlen und im Anschluss wurden die Zentrifugationsröhrchen vollständig mit der Lösung gefüllt. Die Einwirkzeit betrug 15 Minuten. Dann wurden die Röhrchen getrocknet, mit H₂O bidest gefüllt und über Nacht stehen gelassen. Abschließend wurden

die Ultrazentrifugationsröhrchen mit H₂O bidest gespült und auf ein Gestell zum Trocknen gegeben.

2.5.1.2. Herstellung der Salzlösungen

Der Dichtegradient in den UZ-Röhrchen wurde mit Salzlösungen aus NaCl und KBr folgender Dichten hergestellt: $d_1 = 1.006$ g/ml, $d_2 = 1.019$ g/ml, $d_3 = 1.063$ g/ml und $d_4 = 1.240$ g/ml. Die Berechnung der erforderlichen Salzmengen zum Erhalt der notwendigen Dichten erfolgte nach der Radding-Steinberg-Formel:

$$[g / ml] = \frac{d_2 - d_1}{1 - (v \cdot d_2)}$$

d_1 = vorhandene Dichte, d_2 = gewünschte Dichte, v = Konstante

Im ersten Schritt wurde als Stammlösung eine NaCl-Lösung der Dichte 1.006 mg/l (d_1) hergestellt:

8.38 g NaCl ad 1 l H₂O bidest. ($v = 0.2826$ bei 15°C).

Zur Verhinderung einer bakteriellen Besiedlung wurden der Stammlösung 0.1% NaN₃ und 0.04% EDTA zugefügt.

Anschließend wurden unter Verwendung der Stammlösung drei weitere Dichtelösungen hergestellt. Dabei wurde in jedes Aliquot der Stammlösung KBr zugegeben:

0.01824 g KBr / ml Stammlösung ($v = 0.2820$ bei 15°C) für d_2 (1.019 g/ml).

0.08222 g KBr / ml Stammlösung ($v = 0.2886$ bei 15°C) für d_3 (1.063 g/ml).

0.37560 g KBr / ml Stammlösung ($v = 0.3050$ bei 15°C) für d_4 (1.240 g/ml).

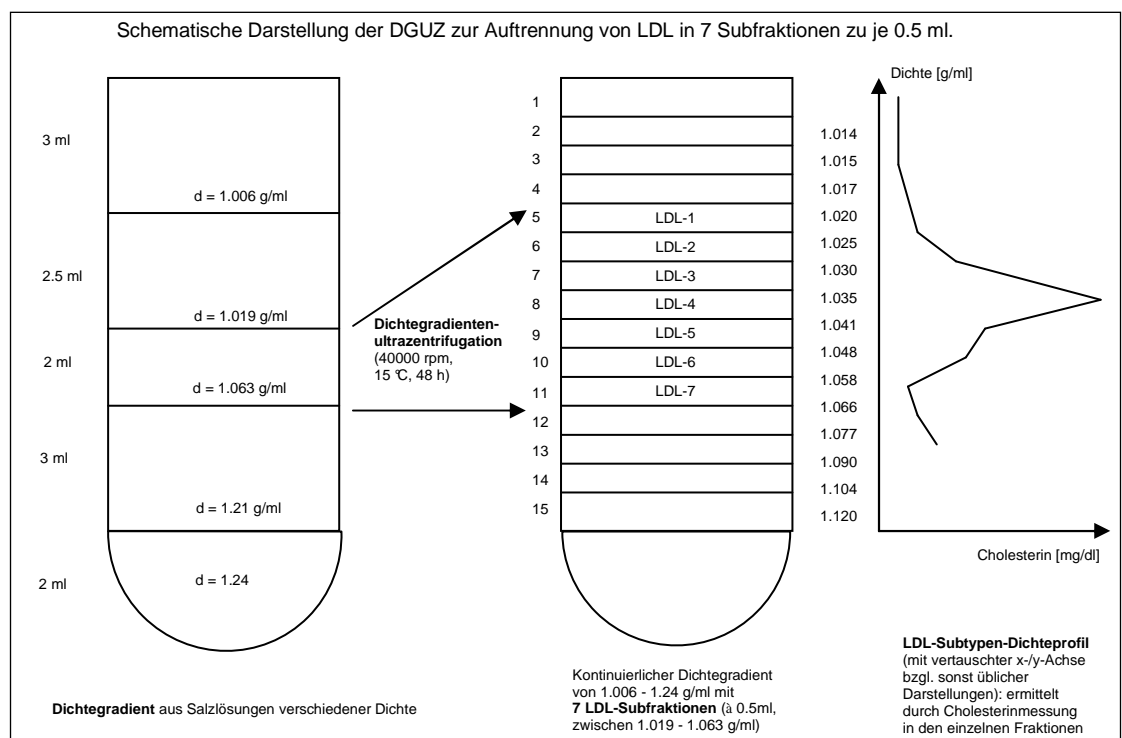
2.5.1.3. Vorbereitung der Plasmaproben

Zu 3 ml Plasma mit einer angenommenen Dichte von 1.006 g/ml wurden 0.966 g KBr zugefügt. Mit Hilfe des Vortex wurde das Salz vollständig in Lösung gebracht und so eine Dichte der Probe von 1.210 g/ml eingestellt.

2.5.1.4. Erzeugung des Dichtegradienten

Die Zusammensetzung des Dichtegradienten in einem UZ-Röhrchen ist in Abbildung 5 gezeigt. Er besteht aus fünf Schichten, wobei die Dichte von unten nach oben abnimmt.

Abbildung 5: Schematische Darstellung der DGUZ



Die vier unterschiedlichen Salzlösungen und das Plasma wurden zur Herstellung des Gradienten in je ein kleines 3.5 ml-Röhrchen pipettiert. Der Inhalt jedes Röhrchens wurde anschließend durch eine Rollenpumpe mit

konstanter Geschwindigkeit über dünne Gummischläuche in das jeweilige Zentrifugationsröhrchen geschichtet. Auf diese Weise entstand ein diskontinuierlicher Dichtegradient, der sich aus 2 ml NaCl/KBr-Lösung der Dichte 1.240 mg/dl am Boden, dann darüber 3 ml Plasma der Dichte 1.210 mg/dl, 2 ml NaCl/KBr-Lösung der Dichte 1.063 mg/dl, 2.5 ml NaCl/KBr-Lösung der Dichte 1.019 mg/dl und schließlich zuoberst 2 ml NaCl/KBr-Lösung der Dichte 1.006 mg/dl zusammensetzte. Anschließend wurden die Zentrifugationsröhrchen vorsichtig in die Schwinghaube des „Swinging-bucket-Rotors“ (SW 40Ti, Beckman) gegeben und dieser in den Rotor der Zentrifuge eingehängt. Es konnten jeweils sechs Proben pro Rotor aufgetrennt werden.

2.5.1.5. Eigenschaften der Ultrazentrifugation

Ein Lauf enthielt jeweils die sechs Plasmaproben desselben Patienten, um eine inter-assay-Varianz auszuschließen. Die Ultrazentrifugation wurde bei 15°C mit 40000 Umdrehungen und einer Dauer von 48 Stunden durchgeführt (relatives Zentrifugalfeld bei 40000 U/min.: 202000 g). Zur Vermeidung einer Durchmischung des Dichtegradienten erfolgte die Dezeleration des Rotors ohne Bremse.

2.5.1.6. Fraktionierung der LDL-Subtypen und Erstellung des LDL-Dichteprofiles

Die Zentrifugationsröhrchen wurden nach Entnahme des Rotors aus der Zentrifuge in einen Reagenzglashalter gespannt. Dann wurden mit einer Eppendorfpipette 15 Fraktionen à 0.5 ml (ohne Durchmischung des

Gradienten oder Blasenbildung) jeweils von der obersten Schicht des Gradienten sukzessive abgehoben.

Anschließend wurden die Cholesterinkonzentrationen in den 15 Fraktionen mit einem Autoanalyzer (EPOS, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Hierbei wurden die Proben nach gründlicher Durchmischung und zehninütiger Inkubation bei Raumtemperatur gegen den Reagenzienleerwert photometrisch gemessen. Es wurden immer zwei Messwerte in einer Doppelbestimmung ermittelt, bei denen nur Abweichungen < 1% akzeptiert wurden, und von denen das arithmetische Mittel zur weiteren Datenanalyse verwendet wurde.

Dem Dichtebereich der LDL-Partikel ($d = 1.019 - 1.063 \text{ g/ml}$) entsprachen die Fraktionen 5 - 11. Demnach konnten sieben LDL-Subfraktionen isoliert werden, deren Dichtebereiche in Tabelle 1 zu finden sind (siehe auch Abbildung 5). In diesen sieben LDL-Subfraktionen wurden die ApoB-Konzentrationen wieder immunnephelometrisch gemessen (Nephelometer, Dade, Behring, Deutschland, siehe 2.4.2.).

Die LDL-Subfraktionen 1 und 2 ($d = 1.019 - 1.029 \text{ g/ml}$) wurden als große, leichte LDL (= large-buoyant LDL) definiert, die LDL-Subfraktionen 3 und 4 ($d = 1.030 - 1.040 \text{ g/ml}$) als LDL intermediärer Dichte (= intermediate-dense LDL) und die LDL-Subfraktionen 5 bis 7 ($d = 1.041 - 1.063 \text{ g/ml}$) als kleine, dichte LDL (= small-dense LDL) (siehe Tab. 1). Diese drei Gruppen von LDL-Subtypen wurden dann auch für die Beschreibung des Wiederanstiegs und für die Kinetiksimulationen verwendet.

Tabelle 1:

Dichtebereich der sieben LDL-Subfraktionen

LDL-Subfraktion	Dichtebereich [g/ml]	LDL-Subtyp
LDL-1	1.019 - 1.024	large-buoyant LDL
LDL-2	1.025 - 1.029	large-buoyant LDL
LDL-3	1.030 - 1.034	intermediate-dense LDL
LDL-4	1.035 - 1.040	intermediate-dense LDL
LDL-5	1.041 - 1.047	small-dense LDL
LDL-6	1.048 - 1.057	small-dense LDL
LDL-7	1.058 - 1.063	small-dense LDL

Die LDL-Subtypen wurden durch die jeweilige Cholesterin- sowie ApoB-Konzentration quantifiziert (siehe Abb. 6a). Weiterhin wurde der relative Anteil des jeweiligen LDL-Subtyps berechnet (= LDL-Subtypenprofil, siehe Abb. 6c), indem die LDL-Cholesterin- bzw. LDL-ApoB-Konzentration des jeweiligen LDL-Subtyps durch die Gesamt-LDL-Cholesterin- bzw. Gesamt-LDL-ApoB-Konzentration (LDL-Cholesterin 1-7, LDL-ApoB 1-7) geteilt wurde.

Abbildung 6a: LDL-Cholesterinprofil

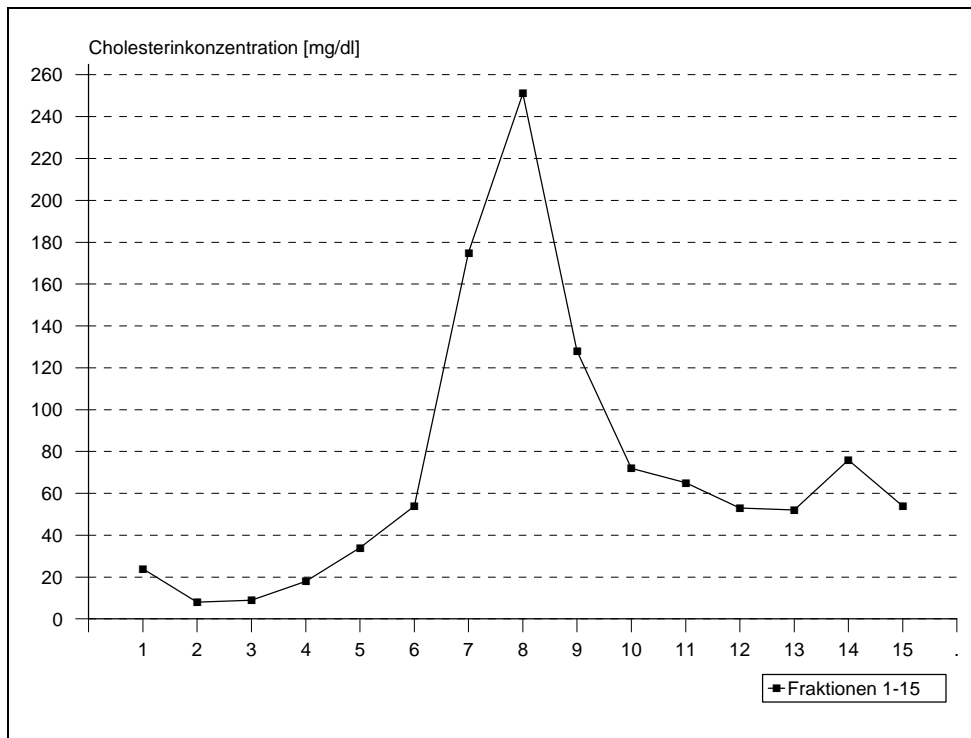


Abbildung 6b: Dichtereferenzkurve

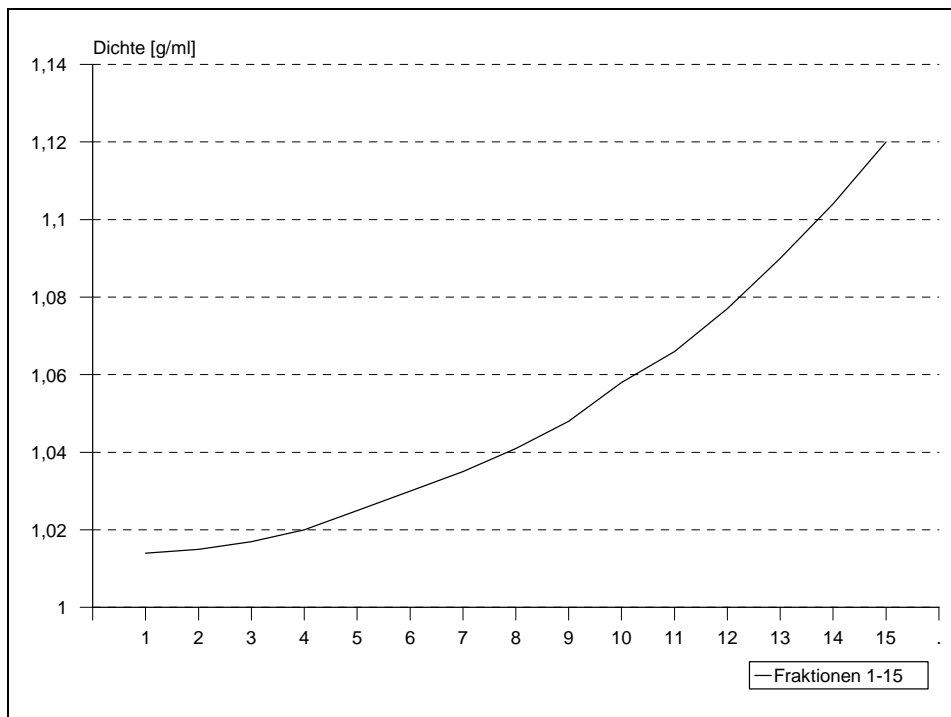
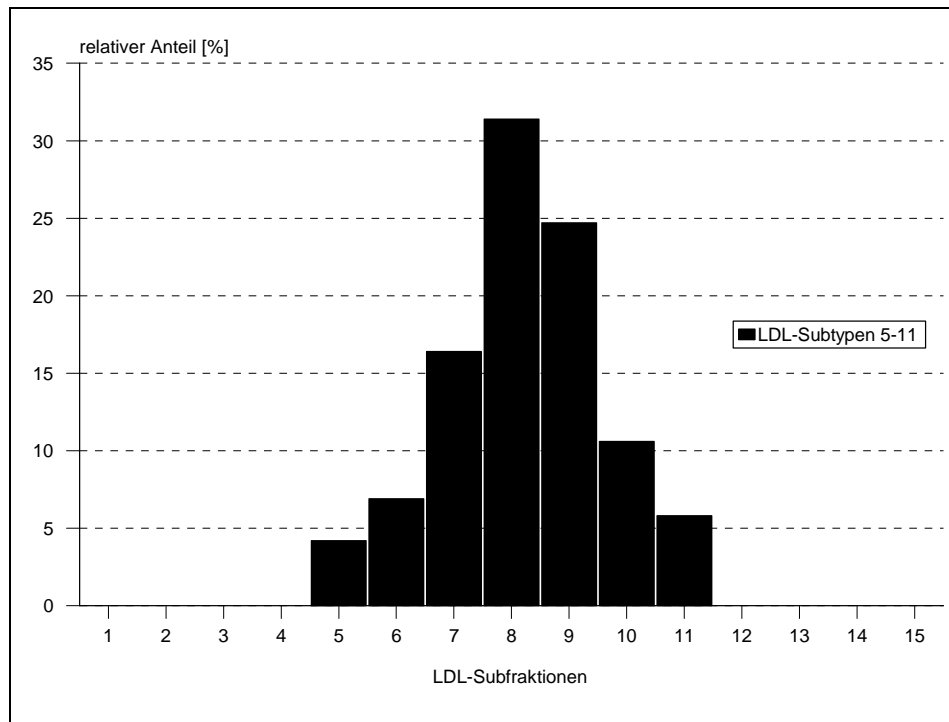


Abbildung 6c: LDL-Subtypen-Dichteprofil



2.5.1.7. Standard

Es wurde eine Standardkurve mit einem Kontrollgradienten ermittelt, der aus einer NaCl/KBr-Lösung ($d = 1.21 \text{ g/ml}$, zu 3 ml NaCl-Stammlösung 0.966 g KBr gegeben), anstatt aus Plasma, konstruiert war. Dieser Kontrollgradient wurde in sieben Aliquots zu je 1 ml abgehoben. Die einzelnen Dichten wurden in den erhaltenen Fraktionen bei 15°C gemessen (Densitometer, Anton Paar, Graz, Österreich). Daraus wurde eine Referenzkurve erstellt, und aus dieser konnten die Dichten der jeweiligen LDL-Subfraktionen abgelesen werden. Mit Hilfe dieser Referenzkurven wurden in Vorversuchen der inter- und intra-assay-Variationskoeffizient bestimmt [74], die beide $< 5\%$ betragen [74]. In Tabelle 2 ist zudem die aus 25 Messungen gemittelte Dichte und

Standardabweichung für jede LDL-Fraktion des Kontrollgradienten dargestellt.

Tabelle 2:

Mittlere Dichte d. einzelnen LDL-Fraktionen d. Kontrollgradienten (n = 25)

LDL-Fraktion	mittlere Dichte [g/ml]	Standardabweichung
1	1.014	0.0005
2	1.017	0.0005
3	1.024	0.0008
4	1.034	0.0007
5	1.047	0.0013
6	1.066	0.0013
7	1.089	0.0024

aus Vorversuchen des Labors, publiziert von Schamberger et al. [74]

2.5.2. Bezugsquellen der Chemikalien und Geräte

Folgende Chemikalien wurden für die DGUZ verwendet:

- zur Beschichtung der Röhren:

- Polyvinylalkohol, Merck, Darmstadt
- Isopropanol (2-Propanol), Merck, Darmstadt

- für die Salzlösungen des Dichtegradienten:

- Natriumchlorid (NaCl), Merck, Darmstadt
- Kaliumbromid (KBr), Merck, Darmstadt
- Natriumazid (NaN₃), Merck, Darmstadt
- Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz, Titriplex III, Merck, Darmstadt

- für die Lipidbestimmungen:

- Monotest Cholesterin Reagenzlösung, Boehringer, Mannheim
- Heparin-Natrium Braun 25000 IE/5 ml, Braun Melsungen, Melsungen
- Mangan-II-chlorid (2 mol/l), Merck, Darmstadt
- Triglyzeride GPO-PAP, Boehringer, Mannheim
- Phospholipide MPR2, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

An Geräten kamen zum Einsatz:

- Ultrazentrifugations-Röhrchen: Ultra-Clear, 14 x 95 mm, Beckman
- Reagenzröhrchen: 3.5 ml, 55 x 12 mm, Polystyrol, Sarstedt
- Schlauchpumpe: Mikropumpe, ISMATEC
- Rotor: SW 40 Ti, Beckman
- Pasteurpipetten aus Glas, ca. 15 mm, Brand
- Pipette, 100 - 1000 µl, Eppendorf
- EPOS, Autoanalyzer, Eppendorf
- Densitometer, Anton Paar DMA 38, Graz, Österreich

2.6. Kinetische Modelle

Es wurden drei verschiedene Modelle entworfen, um den LDL-Subtypen-Metabolismus nach Apherese zu erklären. Modell A (Abb. 2) besagt, dass small-dense LDL durch Delipidierung von large-buoyant LDL und intermediate-dense LDL entstehen. In Modell B (Abb. 3) wird davon ausgegangen, dass large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL direkt aus LDL-Vorläuferstufen (VLDL oder IDL) unabhängig voneinander gebildet werden. In Modell C (Kombination aus Modell A und B, Abb. 4) ist die Bildung von small-dense LDL-Subtypen sowohl durch

Delipidierung aus VLDL/IDL-Vorläufern als auch durch die Delipidierung von large-buoyant oder intermediate-dense LDL möglich.

2.7. Computerprogramm und Modelling

Mithilfe einer Computersimulation wurde berechnet, welches der drei oben genannten Modelle den Wiederanstieg der large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL nach LDL-Apherese am besten beschreiben kann. Dafür wurde zuerst unter Vorgabe jedes der drei Modelle der zu erwartende Wiederanstieg der large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL durch das Computerprogramm simuliert. Für das Modelling wurde angenommen, dass keiner der metabolischen Parameter (FCR = fraktionelle katabolische Rate, PR = Produktionsrate, Definitionen siehe 2.8.) durch die LDL-Apherese beeinflusst wird. Zudem wurde vorausgesetzt, dass alle Stoffwechselraten der jeweiligen Modelle während der Dauer der Studie konstant blieben. Die initialen Bedingungen (Masse innerhalb jedes Kompartiments zu Studienbeginn) wurden nach den Konzentrationsmessungen in jeder einzelnen LDL-Subfraktion festgelegt.

Alle Computersimulationen wurden mit dem SAAM II Programm (Version 1.1; SAAM Institut, Seattle, Washington, USA) berechnet.

Es wurde dasjenige Modell für die weiteren Berechnungen verwendet, welches die beste Übereinstimmung zwischen erwarteten und gemessenen Werten, den besten „fit“, zulässt. Hierfür wurde auch das AIC (= Akaike Information Criterion) berechnet, welches die Qualität des Fits mathematisch ausdrückt: Je niedriger der Wert des AIC, desto besser stimmen erwartete mit gemessenen Daten überein.

Dieser Modelling-Prozess wurde sowohl mit den Konzentrationsdaten von ApoB wie auch mit den Cholesterin-Konzentrationsdaten durchgeführt.

2.8. Berechnung metabolischer Parameter

Auch die Berechnung der metabolischen Parameter, FCR (fractional catabolic rate) und PR (production rate), wurden aus dem Modell mit dem besten Fit abgeschätzt. Dabei ist die FCR (= fractional catabolic rate) die Umsatzrate der jeweiligen LDL-Subtypen. Das heißt, sie ist eine relative Größe, die angibt, welcher Anteil eines Kompartiments pro Zeiteinheit (d^{-1}) umgesetzt wird, wobei die Poolgröße durch die jeweilige Konzentration von large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL repräsentiert wird. Die PR (= production rate) ist eine aus Poolgröße und FCR entsprechend der Formel: $PR = FCR \times Pool$ abgeleitete Größe, und gibt die pro Tag produzierte Menge von large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL an ([mg/kg/Tag]).

2.9. Statistische Analyse des Wiederanstiegs der LDL-Subtypen

Da AIC, FCR und PR nicht einer Normalverteilung unterlagen, wurden für die statistische Auswertung nicht-parametrische Tests verwendet. Der Wilcoxon-Test wurde für verbundene Stichproben ($k = 2$) angewandt, der Friedman-Test kam für mehr als 2 verbundene Stichproben ($k > 2$) zur Anwendung. Die jeweiligen FCR für large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL, die aus dem Wiederanstieg der LDL-ApoB- und LDL-Cholesterin-Subfraktionen stammen, wurden unter Anwendung des Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben ($k = 2$) verglichen.

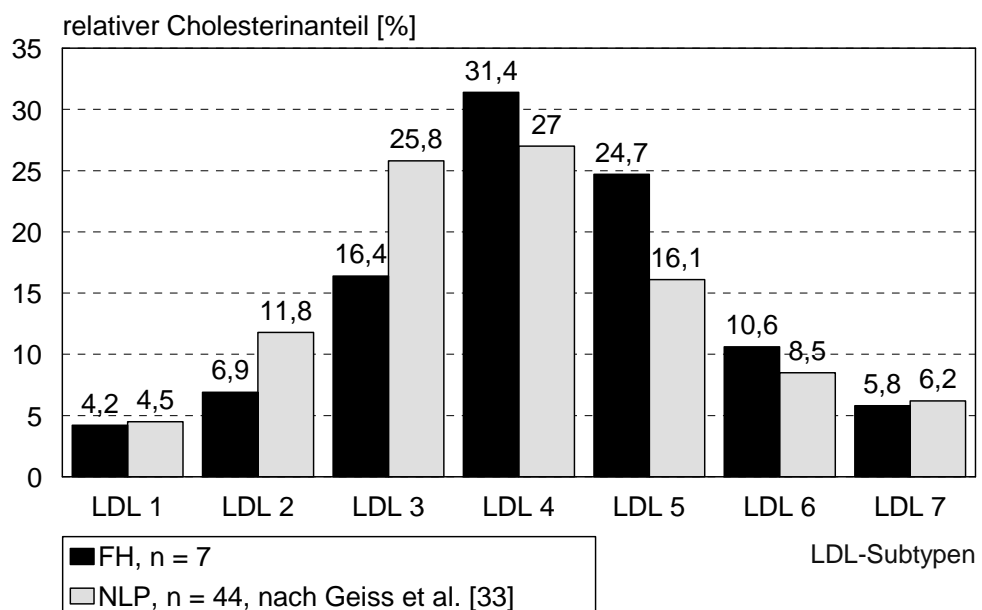
3. ERGEBNISSE

3.1. LDL-Subtypenprofil vor LDL-Apherese bei Patienten mit FH

Um das LDL-Subtypenprofil der Patienten mit FH zu beurteilen, wurden die einzelnen LDL-Subtypen mit denen stoffwechselgesunder Probanden (aus [33], n = 44, Alter 41±10, m : w = 16 : 28, LDL-Chol < 159 mg/dl, TG < 151 mg/dl) verglichen (Abb. 8). Bei beiden Gruppen dominiert der Anteil an LDL-4, bei den FH-Patienten mit 31,4% und bei dem Normalkollektiv mit 24,7%. Der relative Anteil von LDL-5 ist bei den FH-Patienten höher als bei den Gesunden (24,7% vs. 16,1%).

Abbildung 8: LDL-Subtypen vor Apherese

LDL-Subtypen vor Apherese bei FH im Vergleich zu einer Normalpopulation (NLP)

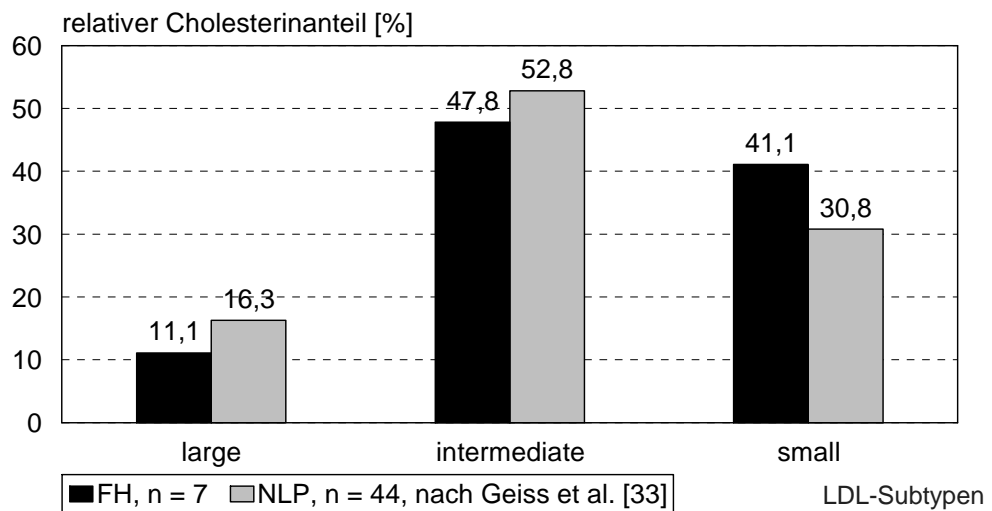


In Abbildung 9 sind die Verteilungen der LDL-Subtypen noch einmal unter Gruppierung zu large-buoyant (LDL-1 und LDL-2), intermediate-dense (LDL-3 und LDL-4) und small-dense LDL-Subtypen (LDL-5, LDL-6 und LDL-7) gezeigt. Hierbei fällt der etwas höhere Anteil an small-dense LDL

bei den FH-Patienten auf, der vor allem durch die Unterschiede in LDL-5 zustande kommt (Abb. 8).

Abbildung 9: LDL-Subtypen bei FH im Vergleich zu NLP

LDL-Subtypen bei FH im Vergleich zu einer Normalpopulation (NLP)



3.2. Effekt der LDL-Apherese auf Lipide bei FH

3.2.1. Einfluss auf Plasmalipide

Wie in Tabelle 3a gezeigt wird, führte die LDL-Apherese in der Patientengruppe zu einer Reduktion des Gesamt-Cholesterins um $57\pm 7\%$, des LDL-Cholesterins um $71\pm 7\%$, des Apolipoprotein B um $68\pm 8\%$, des HDL-Cholesterins um $13\pm 9\%$ und der Triglyzeride um $49\pm 17\%$ ($p < 0.05$ für alle Variablen, Wilcoxon-Test).

Tabelle 3b gibt die Lipidkonzentrationen im Plasma vor und nach LDL-Apherese für die einzelnen Patienten an.

Tabelle 3a:

Lipoproteinkonzentrationen vor und direkt nach LDL-Apherese sowie vor der nächst folgenden Apherese (7 Tage später).

Zudem ist der Wiederanstieg (in %) von Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Apolipoprotein B und HDL-Cholesterin an den Tagen 2 und 3 nach Apherese im Vergleich zu den Prä-Apherese-Werten gezeigt.

	Gesamt-Cholesterin	LDL-Cholesterin	Apo-B	HDL-Cholesterin
Prä-Apherese-Konz. [mg/dl]	255±29	178±28	142±21	46±10
Konz. direkt n. Aph. [mg/dl]	108±9 ^a	51±10 ^a	44±8 ^a	39±8 ^a
Konz. vor nächst. Aph. [mg/dl]	251±48	171±34	137±25	48±12
Reduktion unter Apherese [%]	57±7	71±7	68±8	13±9
Wiederanstieg Tag 2 [%] ^b	74±8	67±11	70±8	99±15
Wiederanstieg Tag 3 [%] ^b	79±8	76±11	79±9	99±14

^a p < 0.05, für Unterschiede zwischen Prä-Apherese-Konzentration vs. Konzentration nach Apherese.

^b Konzentration an Tag 2 (Tag 3) verglichen mit Tag 7.

Tabelle 3b:

Lipoproteinkonzentrationen der einzelnen Patienten vor sowie direkt nach LDL-Apherese.

Patient	Gesamt-Chol		LDL-Cholesterin		ApoB		VLDL/IDL-ApoB	
	[mg/dl]		[mg/dl]		[mg/dl]		[mg/dl]	
	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
A. W.	288	103	215	47	176	41	21	5
F. E.	275	103	213	63	167	49	41	11
K. K.	241	117	167	56	138	43	5	2
L. B.	254	101	176	55	130	36	32	14
S. G.	282	118	165	33	171	52	8	4
S. K.	206	117	137	56	124	59	24	11
S. P.	237	98	171	50	130	40	17	7
MW	255	108	178	51	148	45	17	5
±SD	±29	±9	±28	±10	±22	±8	±12	±3

3.2.2. Auswirkungen auf LDL-Subtypen

Die LDL-Apherese bewirkte einen Abfall des LDL-Cholesterins in den large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL-Subtypen um jeweils $66.3 \pm 12.7\%$ ($p < 0.05$), $68.3 \pm 9.0\%$ ($p < 0.05$) und $68.7 \pm 11.7\%$ ($p < 0.05$) (siehe Tab. 4a).

In ähnlichem Umfang wurde auch Apolipoprotein B durch die LDL-Apherese in den large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL-Subfraktionen abgesenkt ($60.3 \pm 12.4\%$ ($p < 0.05$), $66.6 \pm 5.2\%$ ($p < 0.05$) und $68.8 \pm 11.3\%$ ($p < 0.05$), siehe Tab. 4a-b).

Tabelle 4a:

Wiederanstieg von Cholesterin und ApoB in large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL nach LDL-Apherese.

Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD.

	vor Apherese [mg/dl]	nach Apherese [mg/dl]	Reduktion [%]	Wieder- anstieg Tag 2 ^b [%]	Wieder- anstieg Tag 3 ^b [%]
lb LDL-Chol	18.1 \pm 5.9	5.8 \pm 1.8 ^a	66.3 \pm 12.7	79 \pm 22	86 \pm 23
id LDL-Chol	80.3 \pm 11.9	25.0 \pm 7.2 ^a	68.3 \pm 9.0	67 \pm 9	75 \pm 14
sd LDL-Chol	72.7 \pm 20.6	20.7 \pm 4.7 ^a	68.7 \pm 11.7	64 \pm 12	75 \pm 15
lb LDL-ApoB	11.4 \pm 3.1	4.5 \pm 1.6 ^a	60.3 \pm 12.4	85 \pm 16	96 \pm 23
id LDL-ApoB	60.3 \pm 7.2	20.0 \pm 2.7 ^a	66.6 \pm 5.2	69 \pm 7	79 \pm 13
sd LDL-ApoB	64.8 \pm 18.9	19.2 \pm 5.9 ^a	68.8 \pm 11.3	67 \pm 9	78 \pm 15

^a signifikant ($p < 0.05$) unterschiedlich im Vergleich zu Prä-Apherese-Werten.

^b Der Wiederanstieg bezieht sich auf den Anteil (%) der Cholesterin- bzw. ApoB-Konzentration von large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL, der an Tag 2 und Tag 3 erreicht wird, im Vergleich zum Prä-Apherese-Wert.

Tabelle 4b:

ApoB der jeweiligen Patienten in den large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL-Subfraktionen vor und nach Apherese.

Patient	large-buoyant LDL [mg/dl] (%) ^a		intermediate-dense LDL [mg/dl] (%) ^a		small-dense LDL [mg/dl] (%) ^a	
	vor	nach	vor	nach	vor	nach
A. W.	11.6 (7%)	4.4 (11%)	55.0 (35%)	17.5 (43%)	91.1 (58%)	18.9 (46%)
F. E.	12.0 (10%)	4.6 (12%)	61.6 (51%)	22.4 (58%)	47.4 (39%)	11.5 (30%)
K. K.	9.0 (7%)	2.7 (6%)	68.1 (52%)	23.8 (55%)	54.7 (42%)	16.7 (39%)
L. B.	10.6 (9%)	3.8 (11%)	57.8 (49%)	15.0 (42%)	48.7 (42%)	17.3 (48%)
S. G.	18.6 (10%)	7.6 (16%)	68.3 (37%)	20.7 (43%)	96.9 (53%)	20.2 (42%)
S. K.	8.6 (8%)	5.8 (10%)	46.7 (41%)	20.4 (35%)	58.1 (51%)	32.4 (55%)
S.P.	9.6 (7%)	2.6 (6%)	64.9 (50%)	20.1 (50%)	56.6 (43%)	17.7 (44%)
Mittelwert± SD	11.4±3.1 (8±1.4%)	4.5±1.6 (10±3.2%)	60.3±7.2 (45±7.0%)	20.0±2.7 (46±8.3%)	64.8±18.9 (47±7.1%)	19.2±5.9 (43±7.9%)

^a bezieht sich auf den Prozentanteil von ApoB

Die Zusammensetzung der LDL-Subtypen wurde durch die Apherese nicht beeinflusst, da das Cholesterin/ApoB-Verhältnis vor Apherese nicht signifikant unterschiedlich zu der Ratio nach Apherese in den large-buoyant LDL (1.57 ± 0.18 versus 1.35 ± 0.40 , $p = 0.17$), intermediate-dense LDL (1.33 ± 0.07 versus 1.26 ± 0.34 , $p = 0.17$) oder small-dense LDL-

Subtypen (1.13 ± 0.09 vs. 1.13 ± 0.29 , $p = 0.90$ für Unterschiede, Wilcoxon-Test) war.

Als weiterer Parameter für die Darstellung der Komposition der LDL-Subfraktionen wurden die Phospholipide in den einzelnen LDL-Subtypen gemessen. Die hieraus gewonnenen Ergebnisse zeigten ebenfalls keine Änderung in Bezug auf die Komposition der LDL-Subtypen (Daten nicht dargestellt).

3.2.3. Verhalten des LDL-Subtypen-Dichteprofiles

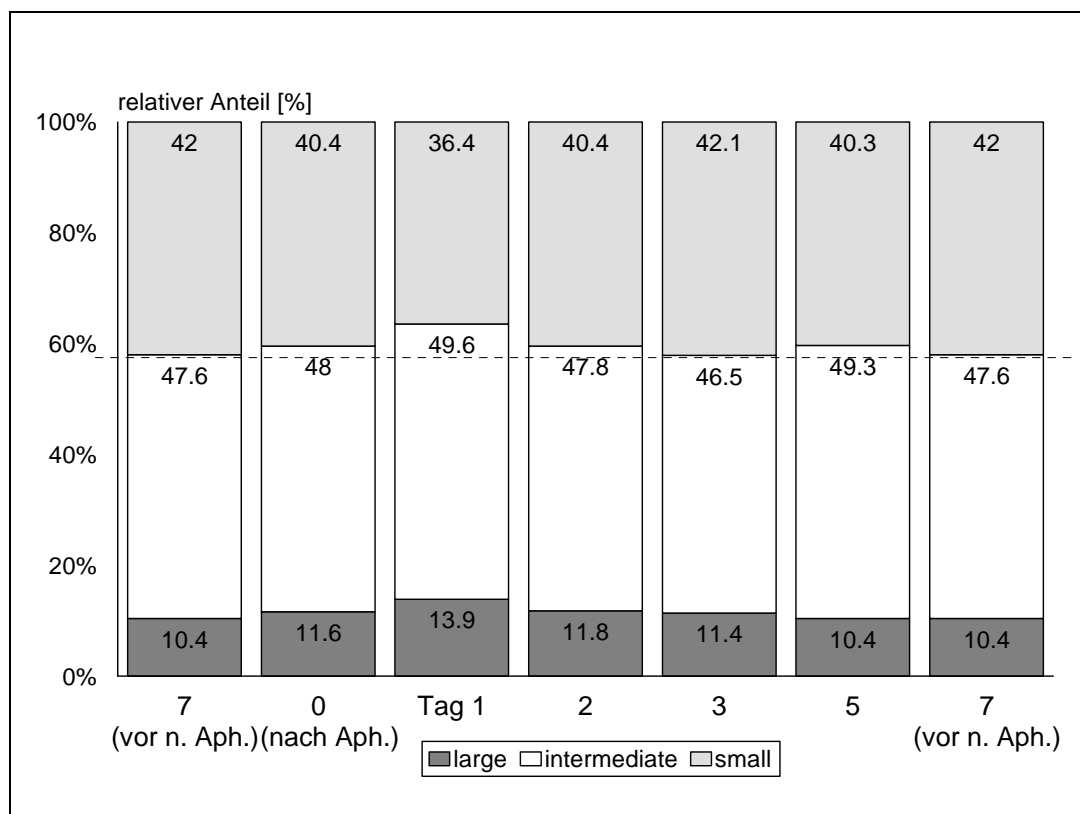
Nach LDL-Apherese konnte eine Verschiebung (Shift) im LDL-Subtypen-Dichteprofil beobachtet werden, d.h. der relative Anteil von small-dense LDL war gegenüber den anderen größeren und weniger dichten LDL-Subtypen (large-buoyant und intermediate-dense LDL) vermindert. Dieser Effekt war unabhängig davon, ob die LDL-Subfraktionen durch den Cholesterin- oder ApoB-Anteil repräsentiert wurden.

Zum Beispiel änderte sich dabei für Cholesterin der prozentuale Anteil der large-buoyant LDL am Tag 0 (direkt nach Apherese) von 10,4% vor Apherese auf 11,6% nach erfolgter Apherese. Der relative Anteil der intermediate-dense LDL-Subfraktion stieg von 47,6% auf 48,0% respektive. Im Gegenzug dazu sank der prozentuale Anteil der small-dense LDL von 42,0% auf 40,4% (siehe Abb. 10).

Am stärksten ausgeprägt war dieser Shift bei beiden Messgrößen am Tag 1 nach Apherese zu beobachten. Hier stiegen die large-buoyant LDL (relativen Anteile) von 11,6% auf 13,9% und die intermediate-dense LDL von 48,0% auf 49,8%, wohingegen die small-dense LDL von 40,4%

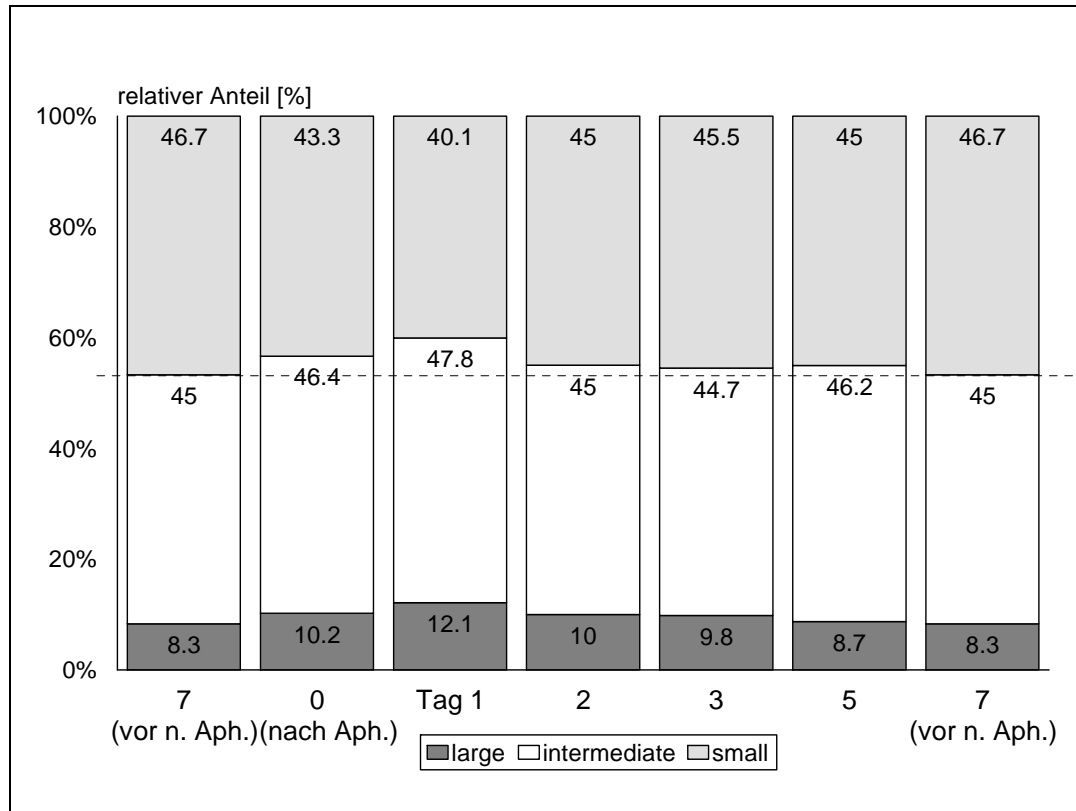
relativem Anteil an der LDL-Subtypen-Verteilung auf 36,4% absanken (siehe Abb. 10).

Abbildung 10: Veränderungen des LDL-Subtypenprofils über 7 Tage (LDL-Subtypen durch den Cholesteringehalt ausgedrückt)



Die durch ApoB repräsentierten LDL-Subtypen zeigten einen ähnlichen Trend: Anstieg von large-buoyant LDL am Tag 0 nach Apherese von 8,3% auf 10,2% und von intermediate-dense LDL von 45,0% auf 46,4%, während die small-dense LDL von 46,7% auf 43,3% absanken. An Tag 1 nach Apherese nahm der relative Anteil der large-buoyant LDL-Subfraktion von 10,2% auf 12,1%, sowie der intermediate-dense Subtypen von 46,4% auf 47,8% zu. Die prozentualen Anteile der small-dense LDL-Subtypen fielen von 43,3% auf 40,1% ab (siehe Abb. 11).

**Abbildung 11: Veränderungen des LDL-Subtypenprofils über 7 Tage
(LDL-Subtypen durch den ApoB-Gehalt ausgedrückt)**

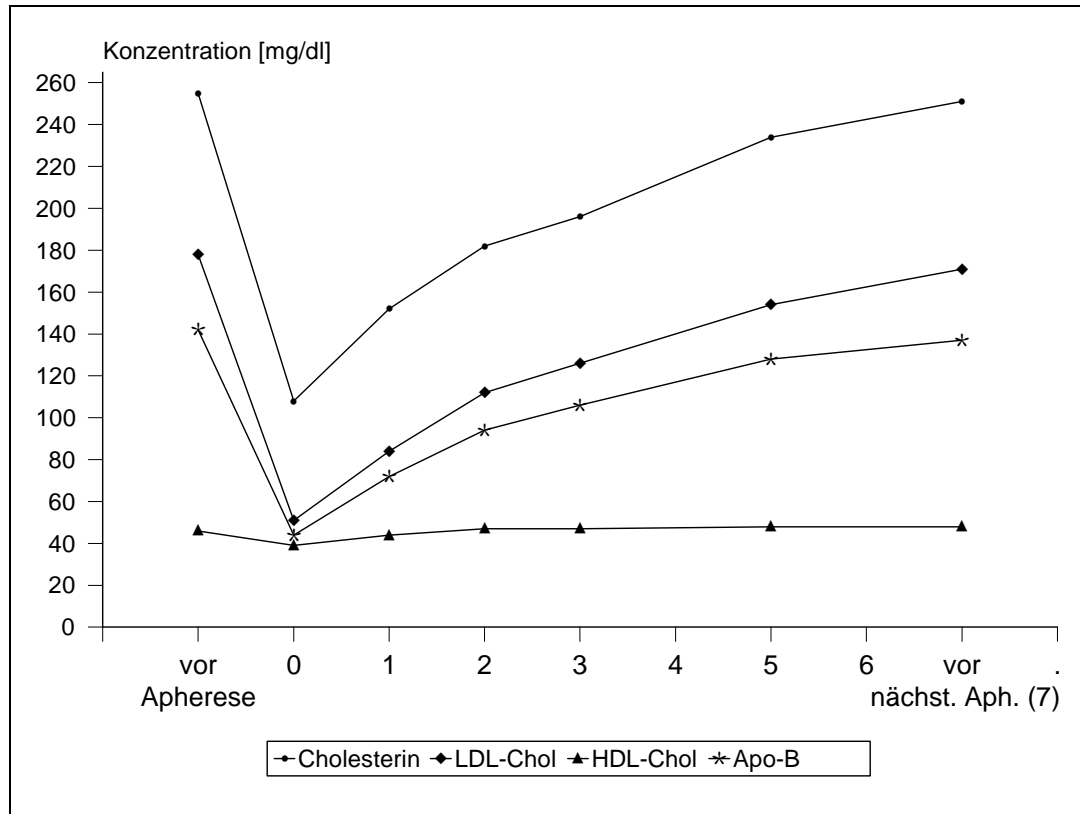


3.3. Wiederanstieg der Lipide nach LDL-Apherese bei FH

Sieben Tage nach Apherese (Tag 7) erreichten LDL-Cholesterin und LDL-ApoB wieder Vor-Apheresewerte, wobei das LDL-Cholesterin dann 171 ± 34 mg/dl und das LDL-ApoB 137 ± 25 mg/dl betrug. Genauso erreichte das Gesamt-Cholesterin mit 251 ± 48 mg/dl und das HDL-Cholesterin mit 48 ± 12 mg/dl wieder seine Prä-Apheresewerte (siehe Tabelle 3a).

Der Verlauf von Cholesterin, LDL- und HDL-Cholesterin sowie von ApoB über 7 Tage nach Reduktion durch LDL-Apherese ist in Abbildung 12 dargestellt.

Abbildung 12: Wiederanstieg von Cholesterin, LDL- und HDL-Cholesterin sowie von ApoB nach LDL-Apherese

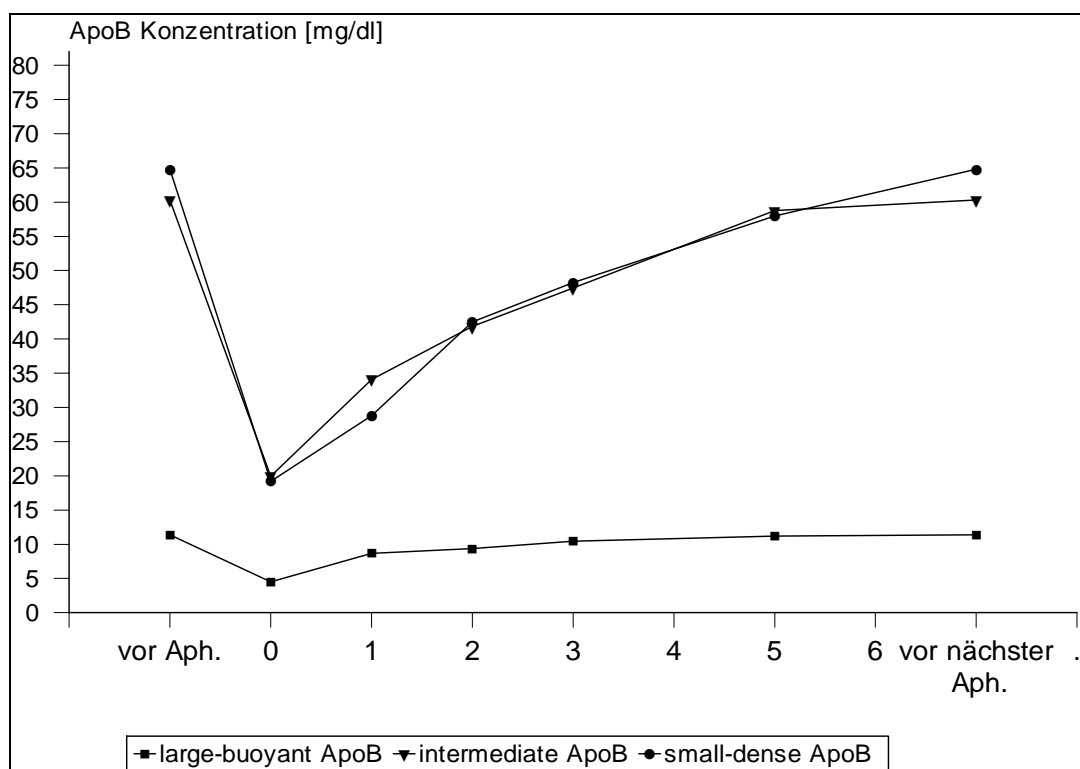


Die Wiederanstiegsrate unterschied sich dabei zwischen den einzelnen Lipidparametern und war für HDL-Cholesterin am höchsten (an Tag 2 $99 \pm 15\%$ und an Tag 3 $99 \pm 14\%$ der Ausgangskonzentration), gefolgt von der Wiederanstiegsrate des Gesamt-Cholesterins mit $74 \pm 8\%$ (Tag 2) und $79 \pm 8\%$ (Tag 3), des LDL-ApoB mit $70 \pm 8\%$ (Tag 2) und $79 \pm 9\%$ (Tag 3) und des LDL-Cholesterins mit $67 \pm 11\%$ (Tag 2) und $76 \pm 11\%$ (Tag 3) (siehe Tab. 3a).

3.4. Wiederanstieg der LDL-Subtypen nach LDL-Apherese

Da jedes LDL-Partikel unabhängig von Größe bzw. Dichte ein ApoB-Molekül enthält, kann hierdurch der Stoffwechsel der LDL-Partikel erfasst werden (vgl. S. 14). Die im Folgenden gezeigten Wiederanstiegsdaten, aus denen die metabolischen Parameter berechnet werden (s. 3.5.), werden daher nur für die ApoB-Messungen gezeigt. Abbildung 13 beschreibt den Wiederanstieg der LDL-ApoB-Konzentrationen in den LDL-Subfraktionen über 7 Tage.

Abbildung 13: Wiederanstiegsverhalten der einzelnen LDL-Subtypen



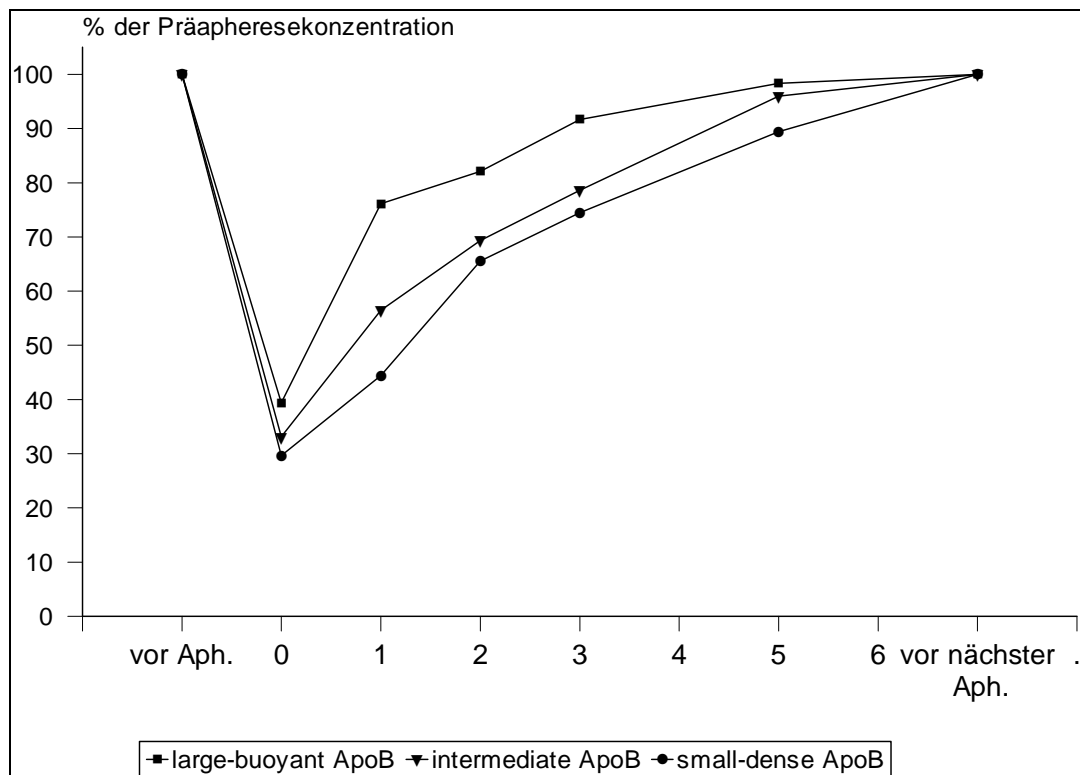
Ob sich zwischen den einzelnen LDL-Subfraktionen Unterschiede im Wiederanstiegsverhalten zeigen, ist aus dieser Abbildung jedoch schwer

ersichtlich. Daher werden im Folgenden die Wiederanstiege in Bezug zu den Ausgangskonzentrationen betrachtet.

In Tabelle 4a wird somit gezeigt, dass der Wiederanstieg (Rebound) für LDL-Cholesterin und LDL-Apo-B sich zwischen den einzelnen Subtypen unterscheidet: die large-buoyant LDL-Subtypen steigen schneller als die intermediate-dense LDL und die small-dense LDL an. Der prozentuale Wiederanstieg des Cholesterins betrug in den large-buoyant LDL an Tag 2 nach Apherese $79\pm 22\%$, in den intermediate-dense LDL $67\pm 9\%$ und in den small-dense LDL $64\pm 12\%$. An Tag 3 nach Apherese stieg das Cholesterin in den large-buoyant LDL-Subtypen auf $86\pm 23\%$ an, in den intermediate-dense LDL auf $75\pm 14\%$ und in den small-dense LDL auf $75\pm 15\%$. In vergleichbarer Weise stieg das ApoB in den large-buoyant LDL-Subfraktionen an Tag 2 nach Apherese auf $85\pm 16\%$, in den intermediate-dense LDL auf $69\pm 7\%$ und in den small-dense LDL-Subtypen auf $67\pm 9\%$ an. An Tag 3 nach Apherese war das ApoB in den large-buoyant LDL auf $96\pm 23\%$ angestiegen, in den intermediate-dense LDL-Subtypen auf $79\pm 13\%$ und in den small-dense LDL auf $78\pm 15\%$.

Die Unterschiede des Wiederanstiegsverhaltens zwischen large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL über sieben Tage werden nochmals graphisch in Abbildung 14 hervorgehoben. Hierbei ist auf der y-Achse der prozentuale Anteil des Cholesterins aufgetragen, der an den Tagen 0 bis 6 gegenüber Tag 7 erreicht wurde.

Abbildung 14: Wiederanstieg (%) der LDL-Subtypen n. LDL-Apherese



3.5. Simulation des Wiederanstiegs von ApoB in den LDL-Subtypen unter Verwendung der Modelle A, B und C

In den Abbildungen 15 - 17 sind die von den einzelnen Modellen (siehe Abb. 2. - Abb. 4. und 1.4.) vorhergesagten Werte (Linien) und die beobachteten Daten (Symbole) dargestellt. Dabei zeigen Abbildung 15 und 16 jeweils einen repräsentativen Patienten (Patient S. P., Abb. 15a - c, Patient F. E., Abb. 16a - c). Bei beiden Beispielen ist zu erkennen, dass die von Modell A prädiktierten Werte (Abb. 15a und Abb. 16a) nicht mit den beobachteten Daten übereinstimmen, während Modell B und C eine relativ gute Übereinstimmung zwischen simulierten und gemessenen Daten zeigen.

Abbildung 15a: Simulation des Wiederanstiegs von ApoB unter Verwendung von Modell A (Patient S.P.)

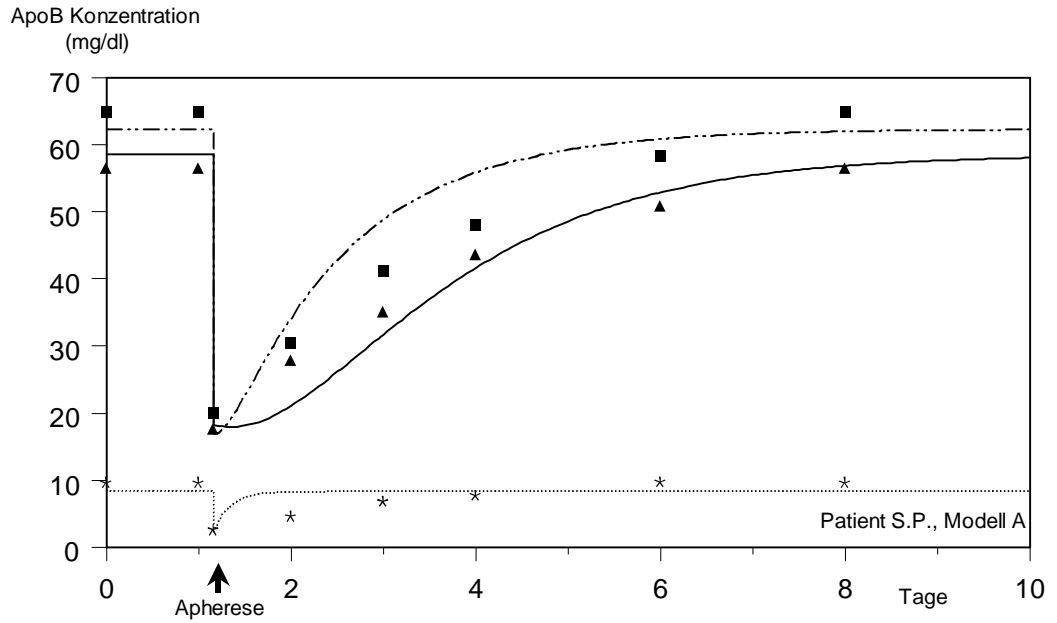


Abbildung 15b: Simulation des Wiederanstiegs von ApoB unter Verwendung von Modell B (Patient S.P.)

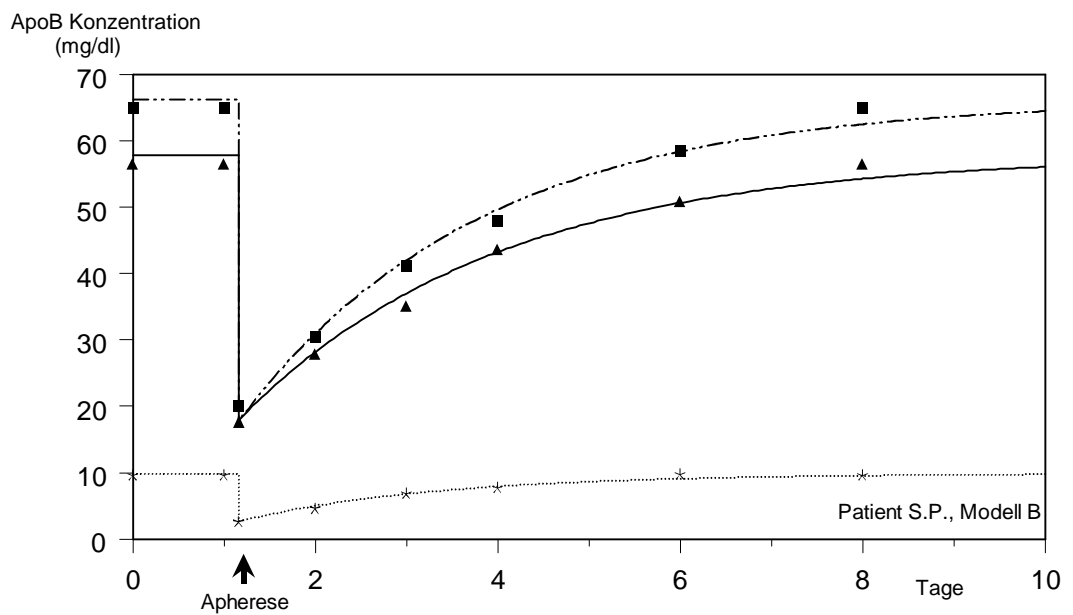


Abbildung 15c: Simulation des Wiederanstiegs von ApoB unter Verwendung von Modell C (Patient S.P.)

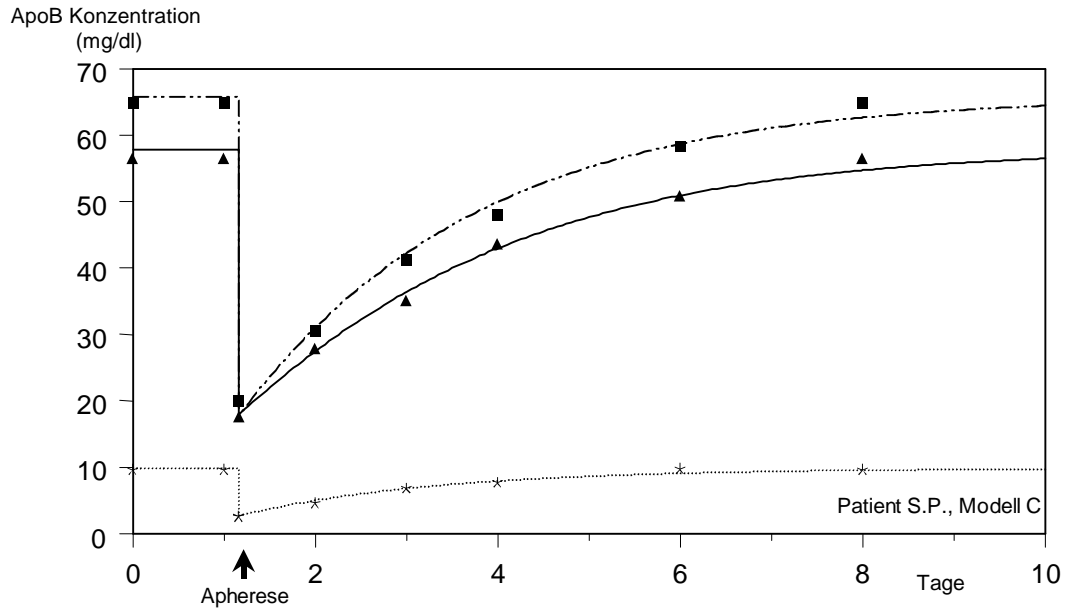


Abbildung 16a: Simulation des Wiederanstiegs von ApoB unter Verwendung von Modell A (Patient F.E.)

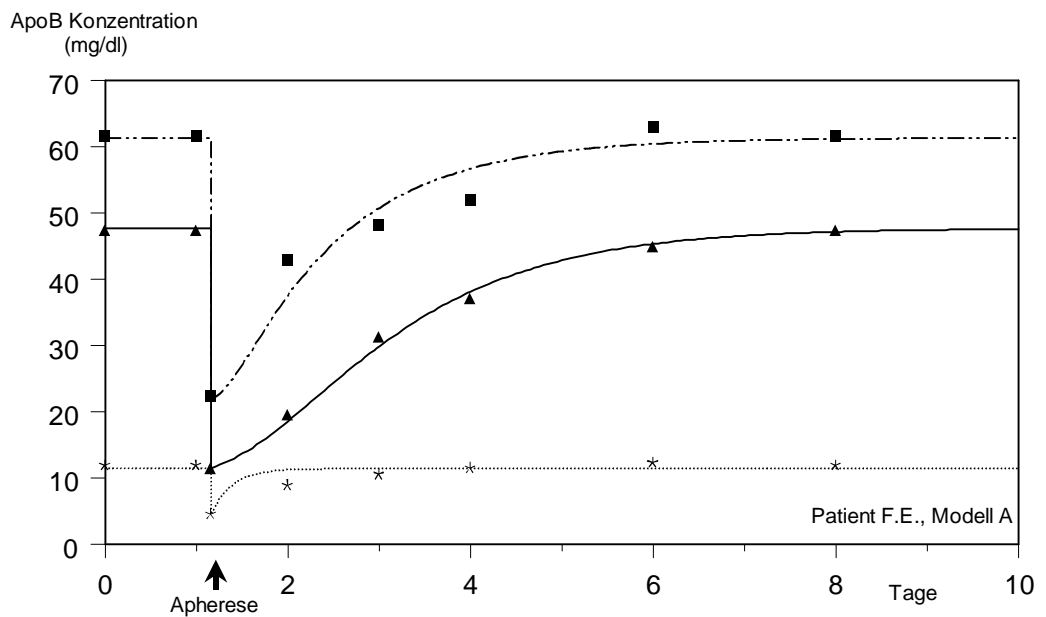


Abbildung 16b: Simulation des Wiederanstiegs von ApoB unter Verwendung von Modell B (Patient F.E.)

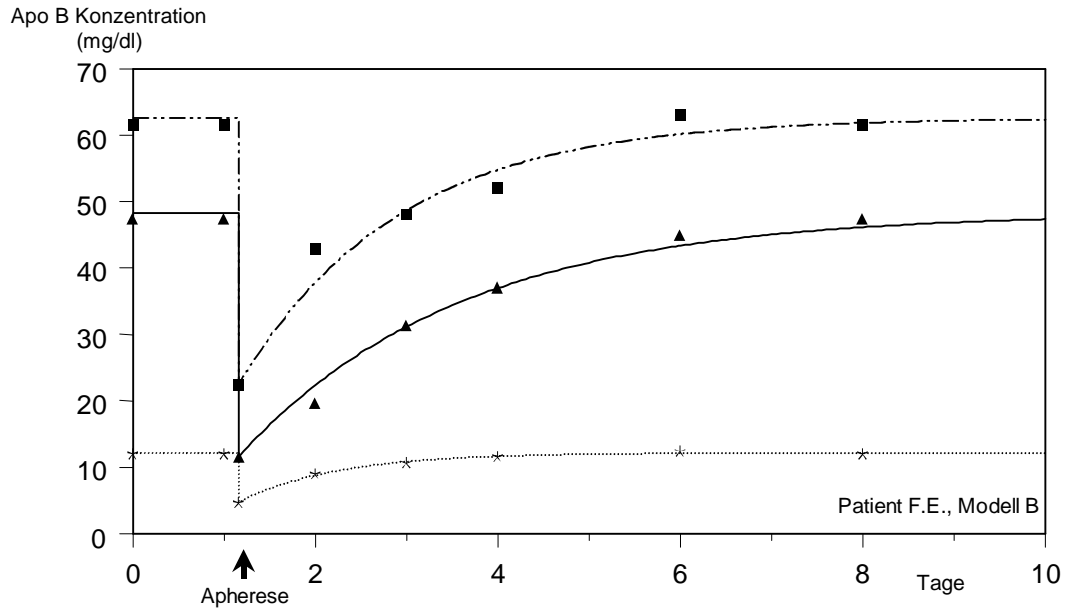
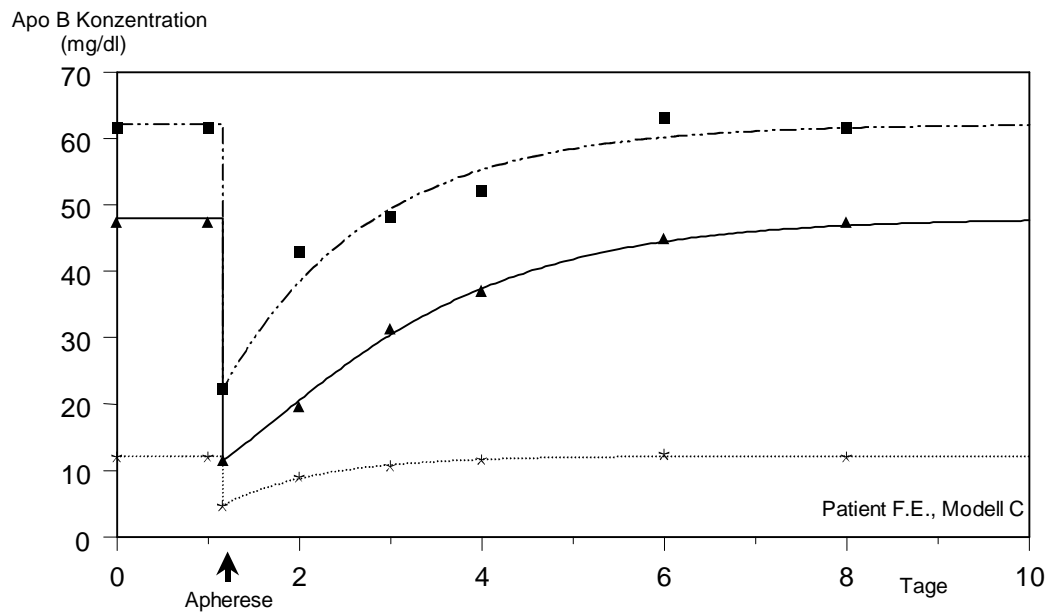


Abbildung 16c: Simulation des Wiederanstiegs von ApoB unter Verwendung von Modell C (Patient F.E.)



Dieses Ergebnis wurde durch die Bestimmung des AIC bestätigt, welches ein mathematisches Maß für die Qualität der Übereinstimmung darstellt (siehe 2.7.), und das für Modell B (3.61 ± 1.64) und Modell C (3.63 ± 1.55) signifikant niedriger war, als für Modell A (4.01 ± 2.59) (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5:

Vergleich der Modelle in Bezug auf das Akaike Information Criterion (AIC).

Patient	ApoB		
	Modell A	Modell B	Modell C
A.W.	3.49	3.32	3.35
F.E.	2.81	2.78	2.82
K.K.	5.16	4.30	4.47
L.B.	2.93	2.85	2.85
S.G.	3.08	2.74	2.79
S.K.	7.15	5.65	5.53
S.P.	2.87	2.84	2.84
alle Patienten ^a	4.01 ± 2.59	3.61 ± 1.65	3.63 ± 1.55

^a Mittelwert \pm SD.

$p = 0.018$ für Modell A vs. Modell B

$p = 0.028$ für Modell A vs. Modell C

$p = 0.39$ für Modell B vs. Modell C (Wilcoxon-Test)

$p = 0.018$ für Modell A vs. B vs. C (Friedman-Test)

Modell B und C sind im Hinblick auf die Übereinstimmung zwischen beobachteten und vom Modell vorhergesagten Werten ähnlich. Neben der optischen Beurteilung zeigten auch die berechneten AIC, dass die Werte zwischen Modell B und Modell C nicht signifikant unterschiedlich waren (siehe auch Tab. 5).

Demnach wurde Modell A für die weiteren Berechnungen der metabolischen Parameter verworfen und diese für die Modelle B und C vorgenommen (siehe Abb. 17a - e).

In den Abbildungen 17a - e sind die von Modell C vorhergesagten und beobachteten Daten für die anderen Patienten dargestellt. Auch bei diesen Patienten zeigt sich eine gute Übereinstimmung für die von Modell C prädiktierten Werte.

3.6. Berechnung des Wiederanstiegs der LDL-Subfraktionen nach Modell C

Obwohl sowohl Modell B als auch Modell C eine gute Übereinstimmung zwischen vorhergesagten und beobachteten Daten zeigen, wurde für die Berechnung der metabolischen Parameter nur Modell C verwendet. Dieses Modell ist biologisch plausibler, da Studien mit endogenen Tracern [27] eine Konversion von large-buoyant LDL zu small-dense LDL zwingend fordern.

Die Abbildungen 17a - e zeigen daher den berechneten Rebound der restlichen fünf Patienten nach Modell C.

Abbildung 17a: Wiederanstieg nach Modell C (Patient A.W.)

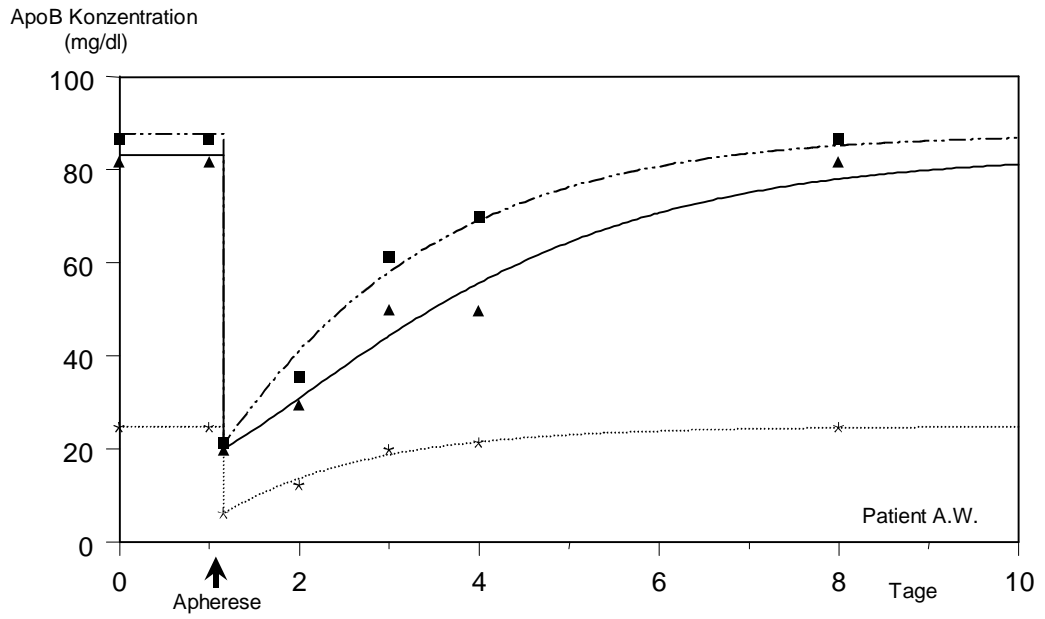


Abbildung 17b: Wiederanstieg nach Modell C (Patient K.K.)

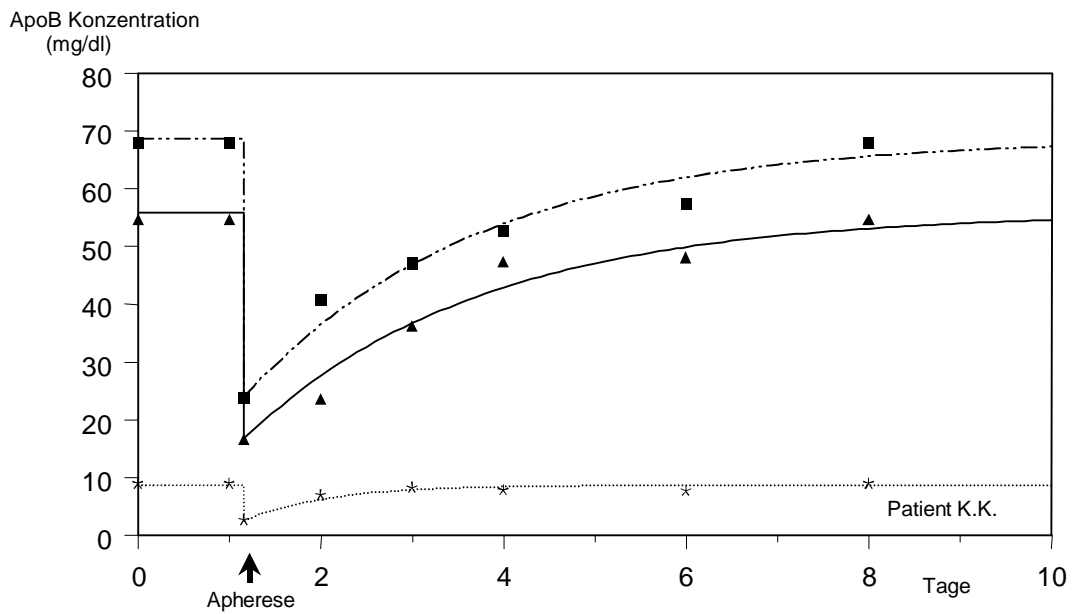


Abbildung 17c: Wiederanstieg nach Modell C (Patient L.B.)

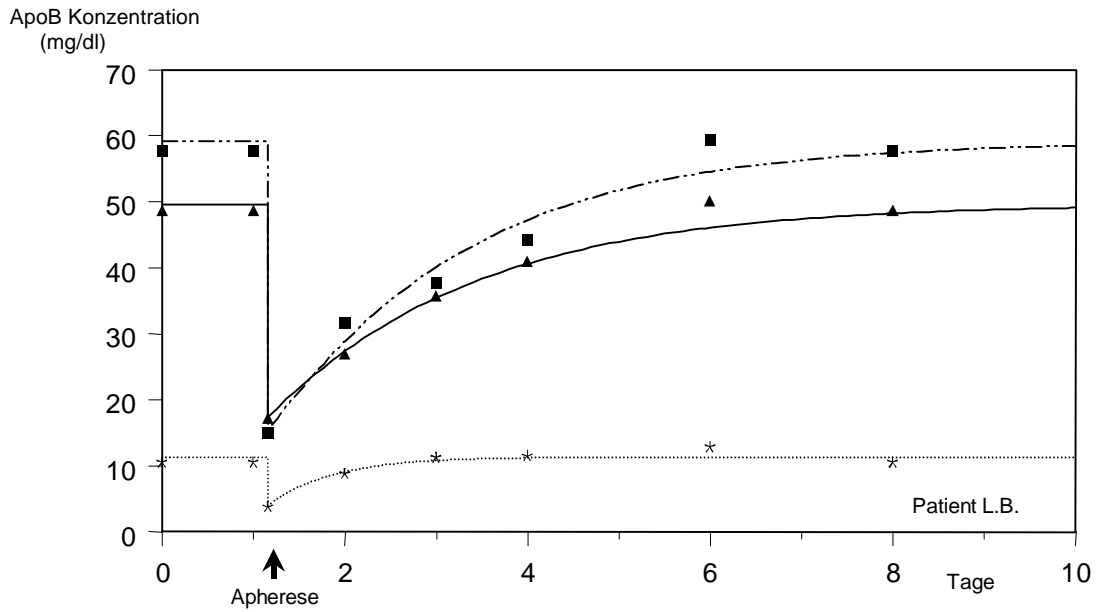


Abbildung 17d: Wiederanstieg nach Modell C (Patient S.G.)

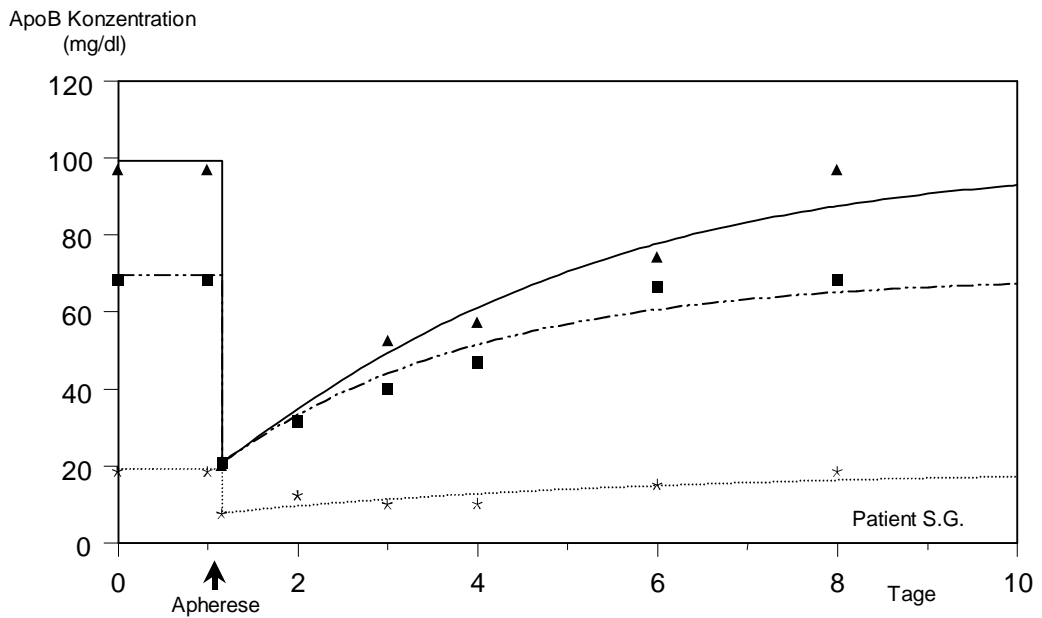
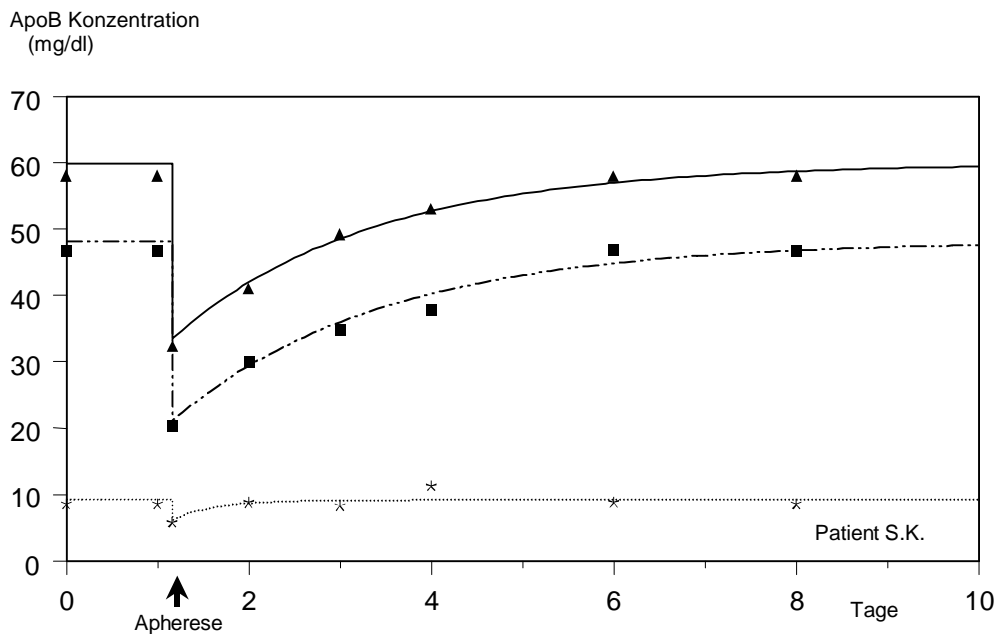


Abbildung 17e: Wiederanstieg nach Modell C (Patient S.K.)



3.7. Berechnung der fraktionellen katabolischen Rate (FCR) von LDL-ApoB (nach Modell C)

In Tabelle 6 sind die FCR von LDL-ApoB von allen Patienten dargestellt, die anhand der Daten des Rebounds nach Modell C berechnet wurden. Bei allen Patienten war die FCR für LDL-ApoB der large-buoyant Subtypen mit $1.05 \pm 0.86 \text{ d}^{-1}$ tendentiell höher als die FCR für LDL-ApoB der intermediate-dense Subfraktionen mit $0.48 \pm 0.11 \text{ d}^{-1}$ ($p = 0.06$, Friedman-Test), während die FCR für LDL-ApoB der intermediate-dense LDL-Subtypen signifikant niedriger war als die FCR des LDL-ApoB der small-dense LDL-Subtypen mit $0.69 \pm 0.24 \text{ d}^{-1}$ ($p = 0.02$, Friedman-Test).

Tabelle 6:

FCR [d^{-1}] von large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL-ApoB, nach Modell C berechnet.

Patient	large-buoyant LDL	intermediate- dense LDL	small-dense LDL	Gesamt-LDL
A.W.	0.63	0.60	0.69	0.35
F.E.	1.09	0.66	0.95	0.52
K.K.	0.69	0.39	0.42	0.42
L.B.	1.51	0.47	0.48	0.56
S.G.	0.48	0.46	0.85	0.38
S.K.	0.20	0.36	0.45	0.26
S.P.	2.75	0.45	0.97	0.71
Mittelwert \pm SD	1.05 \pm 0.86	0.48 \pm 0.11	0.69 \pm 0.24	0.46 \pm 0.18

$p = 0.06$ für large-buoyant vs. intermediate-dense LDL.

$p = 0.40$ für large-buoyant vs. small-dense LDL.

$p = 0.02$ für intermediate-dense LDL vs. small-dense (Wilcoxon-Test).

$p = 0.02$ für large-buoyant vs. intermediate-dense vs. small-dense LDL (Friedman-Test).

3.8. Berechnung der Produktionsrate (PR) von LDL-ApoB (nach Modell C)

Die PR des Gesamt-LDL-ApoB lag zwischen 19.5 und 33.3 $mg \cdot kg \cdot d^{-1}$. Die PR von ApoB in den small-dense LDL-Subtypen befand sich im Bereich zwischen 9.3 und 23.2 $mg \cdot kg \cdot d^{-1}$ (siehe Tabelle 7), was einem Anteil von 35 - 70% an der Gesamtproduktion von LDL-ApoB entspricht.

Tabelle 7:

PR [mg/kg/d] von large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL-ApoB, nach Modell C berechnet.

Patient	large-buoyant LDL	intermediate- dense LDL	small-dense LDL	Gesamt-LDL
A.W.	6.3	21.1	22.9	27.5
F.E.	5.3	16.4	18.0	25.3
K.K.	2.4	10.7	9.3	22.5
L.B.	6.9	11.1	9.6	26.9
S.G.	1.9	12.3	19.7	20.5
S.K.	1.6	9.9	18.0	19.5
S.P.	10.0	8.6	23.2	33.3
Mittelwert±SD	4.9±2.9	12.9±4.1	17.3±5.3	25.1±4.4

$p = 0.03$ für large-buoyant vs. intermediate-dense LDL.

$p = 0.02$ für large-buoyant vs. small-dense LDL.

$p = 0.06$ für intermediate-dense vs. small-dense LDL (Wilcoxon-Test).

$p = 0.02$ für large-buoyant vs. intermediate-dense vs. small-dense LDL (Friedman-Test).

Im Durchschnitt wurde ein Anteil von $56 \pm 30\%$ der small-dense LDL durch direkte Delipidierung von VLDL-/IDL-Vorläuferpartikeln (oder direkte Sekretion von LDL-ApoB) gebildet, während $44 \pm 30\%$ der small-dense LDL durch Konversion von leichteren LDL-Subtypen (large-buoyant und intermediate-dense LDL) entstanden (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8:

Produktion der small-dense LDL-Subtypen von ApoB nach Modell C.

Patient	Produktion aus VLDL/IDL	Indirekte Produktion
A. W.	28%	72%
F. E.	20%	80%
K. K.	100%	0%
L. B.	98%	2%
S. G.	42%	58%
S. K.	45%	55%
S. P.	63%	37%
Mittelwert \pm SD	56 \pm 30%	44 \pm 30%

4. DISKUSSION

4.1. LDL-Subtypen unter Apherese

Wie aus Voruntersuchungen zu sehen ist (unter 3.1. beschrieben), weisen Patienten mit FH ein ähnliches LDL-Subtypen-Dichteprofil auf wie eine gesunde Normalpopulation. Prinzipiell wurde auch in der vorliegenden Arbeit für das FH-Patientenkollektiv ein ähnliches Verteilungsmuster ermittelt, allerdings lag in dieser Gruppe der Anteil an den small-dense LDL-Subtypen in Subfraktion 5 etwas höher. Die zu Grunde liegende Ursache hierfür ist unklar, liegt aber möglicherweise an der LDL-Apherese sowie der begleitenden Statintherapie, da Statine die small-dense LDL-Subtypen bei FH-Patienten nicht so stark absenken wie etwa die large-buoyant LDL-Subfraktion [33] (siehe auch 4.4.1. und 4.5.). Dies hat aber keinen Einfluss auf die durchgeführten kinetischen Analysen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Messung und Beschreibung der Auswirkungen durch LDL-Apherese bzw. des Wiederanstiegs der Subtypen von LDL-ApoB sowie LDL-Cholesterin zur Erfassung des LDL-Subtypen-Metabolismus. Die Beschreibung durch Cholesterin ist allerdings insofern problematisch, da hierdurch keine Partikelzahl repräsentiert wird, sondern eine Partikelbeladung (siehe auch unter 1.4.). Das bedeutet, dass eine veränderte Partikelkomposition fälschlicherweise eine veränderte Partikelbeladung vortäuschen könnte. Allerdings ergaben sich aus den hierfür durchgeführten Untersuchungen (Verhältnis Phospholipide vs. Cholesterin vs. ApoB) keine Hinweise auf eine Veränderung der Komposition der einzelnen LDL-Subtypen, da die Phospholipid/Cholesterin/ApoB-Verhältnisse vor und nach Apherese konstant blieben.

4.2. Bisherige Arbeiten zum LDL-Subtypen-Metabolismus (Tracerstudien)

Der Metabolismus der LDL-Subtypen ist in bisherigen Studien sowohl mit exogen [31, 80, 83] als auch endogen [1, 15, 27, 63] markierten Tracern untersucht worden. In Tabelle 9 werden die wesentlichen Ergebnisse aus diesen Untersuchungen im Hinblick auf die Bildung von small-dense LDL gezeigt, um die Interpretation der in der vorliegenden Studie gewonnenen Daten zu erleichtern.

Tabelle 9:

Überblick über Studien zum LDL-Subtypen-Metabolismus

Studie	[80] Teng et al. 1986	[83] Thompson et al. 1987	[15] Campos et al. 1997	[1] Aguilar-S. et al. 1997	[27] Fisher et al. 1991	[63] Packard et al. 2000	vorliegende Promotionsarbeit
Tracer	exogen, [¹²⁵ I]-VLDL	exogen, [¹²⁵ I]- u. [¹³¹ I]-Lipoproteine	endogen [D ₃]L-Leucin	endogen [¹³ C]Leucin	endogen [³ H]Leucin	endogen [D ₃]Leucin	kein Tracer
Untersuchungs-kollektiv	Hyper-ApoB (n = 7)	FH (n = 5), Kontrollen (n = 2)	postmeno-pausale Frauen (n = 8)	Hyper-ApoB (n = 5)	FH (n = 7)	Kontrollen (n = 20)	FH (n = 7) unter Statinen und regelmäßiger Apherese
LDL-Subtypen	leichte u. schwere LDL durch DGUZ	leichte u. schwere LDL durch DGUZ	leichte u. schwere LDL durch DGUZ	leichte u. schwere LDL durch DGUZ	leichte u. schwere LDL durch DGUZ	LDL-Phänotyp A//B ¹ durch GGE	large-b., interm.-dense u. small-dense LDL durch DGUZ
übereinstimmend mit Modell ^a	C	B, (C) C	B, (C)	A	C	--	C
Konversion ^b	89%	44% 75%	8% (16%) ^d	100%	69%	--	44%
Mittelwert FCR	i-b ^b 1.1 i-d ^c	0.23 0.71	0.59	0.82	0.47	0.55 0.32	1.05 0.48
	s-d	0.4 0.26 0.5	0.41	0.22	0.53	0.36	0.69
Mittelwert PR	i-b ^c 17.1 i-d ^c	9.1 5.9	575 ^d	11.9	--	19.3 21.3	4.9 12.9
	s-d	17.3 14.1 12.8	434 ^d	9.8	--	19.3	17.3

^a bezieht sich auf die in Abbildung 2 - 4 gezeigten Modelle.

^b bezieht sich auf den Prozentanteil der small-dense LDL-Poolgröße, die von large-bouyant LDL abstammt.

^c in einigen Studien wurde nicht zwischen large-bouyant und intermediate-dense LDL unterschieden.

^d bezieht sich auf Frauen, die HRT erhalten.

^e PR angegeben in mg/dl.

^f A, I und B beziehen sich auf large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL durch GGE.

In den bisherigen Arbeiten wurden die verschiedenen LDL-Subtypen generell in "schwere" und "leichte" LDL-Subspezies unterschieden. Diese Studien haben gezeigt, dass schwere LDL entweder direkt aus Vorläuferpartikeln (wie VLDL oder IDL) [15, 83] oder durch Delipidierung aus leichten LDL gebildet werden können [1], oder aber durch eine Kombination von diesen beiden Stoffwechselwegen [27, 31, 80, 83].

4.2.1. Abhängigkeit des LDL-Subtypen-Metabolismus vom Untersuchungs-kollektiv

Der Anteil der schweren LDL, die durch Delipidierung aus leichten LDL gebildet werden, variiert dabei in den Ergebnissen dieser Untersuchungen zwischen 8% [15] und 89% [80], abhängig von der zugrundeliegenden Patientengruppe.

Beispielsweise liegt bei postmenopausalen Frauen der Anteil an „heavy LDL“, die aus delipidierten „light LDL“ entstehen, ohne fettsenkende Therapie bei 8% und steigt unter Hormonersatztherapie (= HRT) auf 16% an [15], während der Anteil bei normolipämischen 48 Jahre alten Männern bei 75% liegt [80, 83]. Bei Patienten mit einer kombinierten Hyperlipoproteinämie wurde ein noch größerer Anteil (89%) schwerer LDL, die durch Delipidierung aus leichten LDL entstanden, beschrieben [80]. Desweiteren gibt es eine Studie, in der die Bildung von „heavy LDL“ ausschließlich durch Delipidierung von „light LDL“ erklärt wird [1]. Dieses

Ergebnis würde demnach zu der Folgerung führen, dass schwere LDL hauptsächlich von leichten LDL stammen [1].

Patienten, die an einer familiären Hypercholesterinämie (FH) leiden, geben wiederum weniger Hinweise darauf, dass small-dense LDL ausschließlich durch Delipidierung aus leichten LDL entstehen, da die intravenöse Verabreichung von radioaktiv markierten VLDL und IDL keine klare Vorläufer-Produkt-Beziehung zwischen leichten und schweren LDL aufdecken konnte [80]. Damit unterscheiden sich diese Ergebnisse wesentlich von denen bei normolipämischen Kontrollgruppen und Patienten mit Hyperapobetalipoproteinämie [80]. Zudem wurde gezeigt, dass bei Patienten mit FH die Injektion von radioaktiv markierten leichten LDL nicht in eine Konversion zu schweren LDL führte. Somit wurde in diesen Untersuchungen postuliert, dass schwere LDL unabhängig von leichten LDL hergestellt werden und direkt von weniger dichten Vorläuferstufen (wie VLDL und IDL) abstammen [80, 83]. Dennoch wurde auch hier eine Konversionsrate von 44% von „light LDL“ zu „heavy LDL“ beschrieben, womit gezeigt wird, dass auch bei Patienten mit FH keine ausschließliche Produktion der „heavy LDL“ durch Delipidierung von LDL-Vorläuferpartikeln möglich ist.

4.2.2. Vergleich der Ergebnisse von Tracerstudien mit exogen versus endogen markiertem Tracer

Weiterhin kamen in einer später erschienenen Studie Fisher et al. [27], bei der Analyse eines ähnlichen Untersuchungskollektivs wie Teng et al. [80], zu dem Ergebnis, dass bei Patienten mit FH 69% der schweren LDL von

leichten LDL stammen, wobei sie in ihrer Studie nicht exogen, sondern endogen markierte Tracer (3H Leucin-Tracer) verwendeten.

Daraus lässt sich ableiten, dass die gegensätzlichen Ergebnisse in Bezug auf den Stoffwechsel der LDL-Subtypen bei Patienten mit FH von der jeweils angewandten Methode abhängen und insbesondere davon, ob exogen oder endogen verabreichte Tracer verwendet wurden.

4.3. Wiederanstiegskinetiken zur Untersuchung des LDL-Subtypen-Stoffwechsels

4.3.1. Rebound-Modelle als Nicht-Tracer-Methode

Da die bisherigen Arbeiten also keine stimmigen Vorstellungen vom Stoffwechsel der LDL-Subtypen ergaben, wurde in der vorliegenden Studie eine Nicht-Tracer-Methode zur Untersuchung dieser Problematik gewählt.

Nach LDL-Apherese stiegen in der vorliegenden Arbeit die Konzentrationen von ApoB und Cholesterin in den large-buoyant LDL-Subfraktionen schneller an als in den intermediate-dense und small-dense LDL-Subtypen. Der Wiederanstieg von ApoB und Cholesterin in den verschiedenen Subtypen konnte dabei am besten mit einem Modell erklärt werden, welches zum einen die direkte Produktion von large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL aus VLDL/IDL-Vorläufern beinhaltet, und zum anderen auch die Bildung von small-dense LDL aus weniger dichten Vorläuferpartikeln, wie large-buoyant und intermediate-dense LDL, beschreibt (Modell C). Im Gegensatz dazu konnte ein Modell, das die alleinige Herstellung von small-dense LDL durch Delipidierung aus weniger dichten LDL-Subfraktionen postuliert (Modell A), den Rebound aus den beobachteten Daten nicht hinreichend wiedergeben. Ein anderes

Modell, das die ausschließliche Produktion von large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL aus LDL-Präkursoren (VLDL/IDL) vorgibt (Modell B), ergab auch ein gutes Übereinstimmen der gemessenen mit den simulierten Daten. Da ein solches Modell jedoch biologisch nicht plausibel erscheint, wurde es nicht zur Berechnung der FCR und PR verwendet.

4.3.2. Ergebnisse der angewandten Methode bezogen auf existierende Tracerstudien

Die vorliegende Untersuchung, die im Gegensatz zu Tracerstudien auf der Wiederanstiegskinetik von Konzentrationen beruht, unterstützt damit die von Fisher [27] erzielten Ergebnisse und widerspricht auch nicht den Resultaten von Thompson [83], die eine Konversionsrate von 44% von „light“ LDL zu „heavy“ LDL (in der vorliegenden Studie ebenfalls 44%) und die maßgebliche Entstehung durch Delipidierung von LDL-Vorläuferpartikeln beschreiben.

Bei der Interpretation und dem Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit anderen Studien muß allerdings beachtet werden, dass hier der Rebound von ApoB in insgesamt sieben LDL-Subtypen untersucht wurde. In den anderen Studien wurden grundsätzlich nur „schwere“ von „leichten“ LDL-Subtypen differenziert und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, drei LDL-Subtypengruppen (large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL).

4.3.3. Weiterführende Turnoverstudie zu Modell C

Um das endgültige Modell (Modell C) weiter zu prüfen, wurde später (nicht im Rahmen der Promotionsarbeit) eine Turnoverstudie mit einer normolipämischen Kontrollperson und stabilen Isotopen durchgeführt (Professor Dr. Parhofer, persönliche Mitteilung). Hierbei wurde ein endogen markierter Tracer angewendet [64]. Die Ergebnisse zeigten, dass die hier errechneten metabolischen Parameter der verschiedenen LDL-Subtypen ebenso am besten mit Modell C erklärt werden konnten. Die FCR (1.01 d^{-1}) und PR ($17.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) für LDL-ApoB waren ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, wenn man berücksichtigt, dass in der vorliegenden Studie (siehe Tab. 6 und 7) Patienten mit FH untersucht wurden, die regelmäßig Statine einnehmen. Die Tatsache, dass das gleiche Modell die Daten von ApoB aus Tracerstudien [27, Parhofer (persönliche Kommunikation)] und aus „non-steady-state“-Kinetiken beschreibt, unterstützt somit weiterhin die Anwendbarkeit von Modell C.

4.4. Berechnete metabolische Parameter (nach Modell C)

4.4.1. Vergleich der FCR zwischen den Studien

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten FCR liegen innerhalb des Bereichs, wie sie auch von anderen Autoren bei Patienten mit FH beschrieben wurden [27, 66, 80], wobei diese Daten wiederum breit streuen können (Tab. 9). An dieser Stelle soll auch erwähnt werden, dass die Gesamt-FCR von LDL-ApoB niedriger liegen kann, als eine der individuellen FCR, da die Modellstruktur eine Konversion zwischen Subtypen zulässt (siehe Abbildung 4).

Die hier ermittelte FCR liegt dabei im oberen Bereich (siehe Tab. 9) der FCR, die in den Tracerstudien bei Patienten mit FH ermittelt wurden. Wie weiter unten noch näher dargestellt wird (siehe 4.5.), könnte dieses Ergebnis mit der in dieser Studie angewendeten Methode in Zusammenhang stehen. Zudem werden die hier beschriebenen Patienten mit Statinen behandelt, also mit Medikamenten, welche die FCR von LDL steigern [1, 7, 31, 65].

Desweiteren konnte, wie bei Packard et al. [63], ein Trend zu höheren FCR bei den large-buoyant LDL-Subtypen gegenüber dichteren LDL-Subtypen festgestellt werden. Dies wurde bei Packard et al. [63] vor allem bei Kontrollpersonen mit dem LDL-Phänotyp A (Personen mit Dominanz von large-buoyant und intermediate-dense LDL-Subtypen) beschrieben.

Um auszuschließen, dass die Unterschiede in den FCR von large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL auf einer unterschiedlichen Kontamination der LDL-Subfraktionen mit ApoE beruhen, wurden nachträglich (außerhalb der Promotionsarbeit) bei vier Patienten die ApoE-Konzentrationen in allen LDL-Subtypen bestimmt. Dabei waren sowohl vor als auch nach Apherese in keiner der LDL-Subfraktionen signifikante Werte an ApoE festzustellen.

In Übereinstimmung mit Fisher et al. [27], Thompson et al. [83] und Packard et al. [63], wurden in dieser Arbeit keine höheren FCR für intermediate-dense LDL im Vergleich zu small-dense LDL festgestellt. Dieses Ergebnis steht somit allerdings in Kontrast zu Tracerstudien bei postmenopausalen Frauen [15] und bei Patienten mit kombinierter Hyperlipoproteinämie [1], in denen für intermediate-dense/“light“ LDL-Subtypen im Vergleich zu small-dense/“heavy“ LDL-Subtypen eine höhere

FCR ermittelt wurde, sowie zu Resultaten aus anderen in vitro-Experimenten [61]. Der Grund für diese Differenzen in den FCR ist nicht klar, beruht aber möglicherweise auf mehreren Faktoren (Art der zugrundeliegenden Stoffwechselstörung, angewandte Methodik, Einflüsse lipidsenkender Medikamente), die im folgenden noch näher diskutiert werden (siehe 4.5.).

4.4.2. Interpretation der errechneten PR

Da die Produktionsrate (PR) aus der fraktionellen katabolischen Rate (FCR) berechnet wird, und somit eine abgeleitete Größe ist, muss auch die Interpretation dieser Werte mit Vorsicht vorgenommen werden (Tab. 7). Dennoch liegen die PR, die in dieser Studie berechnet wurden, innerhalb des Bereichs, der bereits von anderen Autoren beschrieben wurde, die Tracermethoden verwendeten [27, 63, 80]. Die in diesen Arbeiten beschriebenen Daten von Patienten mit FH zeigen, dass ein Anteil von 38% von ApoB die LDL-Fraktion als small-dense LDL erreicht, während 45% von ApoB die LDL-Fraktion als intermediate-dense LDL erreichen [27, 63, 80].

4.5. Limitationen der Studie (Störfaktoren, Fehlermöglichkeiten und Voraussetzungen)

Vorausgehend muss betont werden, dass die dargestellten Ergebnisse nur für Patienten mit heterozygoter familiärer Hypercholesterinämie (FH) gültig sind. Bereits aus den Ergebnissen der Tracerstudien [1, 15, 27, 63, 80, 83] ist ableitbar, dass die Art der zugrundeliegenden Dyslipoproteinämie die beschriebenen Stoffwechselwege beeinflusst (vgl. Tab. 9).

Dies könnte vor allem bei Vorliegen einer Insulinresistenz zutreffen, die sich durch ein Überwiegen von small-dense LDL-Subtypen auszeichnet. Um die Gültigkeit von Modell C bei diesen Patienten zu bestimmen, müssten dann auch konkret diese Patientengruppen untersucht werden.

4.5.1. Begleitmedikation mit Statinen

Modell C postuliert eine unabhängige und direkte Bildung von small-dense LDL mit einem Anteil von im Mittel 56%, während 44% der small-dense LDL durch Delipidierung von large-buoyant LDL und intermediate-dense LDL entstehen. Die Interpretation der Daten muß allerdings vor dem Hintergrund geschehen, dass die hier dargestellten Wiederanstiegskinetiken von Patienten stammen, die mit Statinen behandelt werden, und bei denen regelmäßig eine LDL-Apherese durchgeführt wird. Jeder dieser Faktoren kann eine Rolle für den Metabolismus der einzelnen LDL-Subtypen spielen: Obwohl Statine die absoluten Werte von allen LDL-Subfraktionen absenken, haben vorhergehende Studien gezeigt, dass sich die Verteilung der jeweiligen LDL-Subtypen durch diese Behandlung verändern könnte [16, 32, 33]. Bei normotriglyzeridämischen Patienten (FH und Kontrollen) wird diesbezüglich normalerweise ein leichter relativer Anstieg des Anteils an small-dense LDL festgestellt (ungefähr 5%). Ob diese Beobachtung auch eine Auswirkung auf die hier beschriebenen Stoffwechselwege hat, ist nicht bekannt.

Der Einfluss der Statintherapie auf die abgeschätzten metabolischen Parameter wurde bereits weiter oben (4.4.2.) diskutiert.

4.5.2. Prämissen

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie basieren auf bestimmten Annahmen (vgl. Einleitung 1.4.), die dem Simulationsprogramm vorgegeben wurden. Aufgrund der Ergebnisse vorhergehender Untersuchungen [64] wird davon ausgegangen, dass die Gesamtproduktion von ApoB durch die LDL-Apherese nicht an sich beeinflusst wird. Weiterhin wurde angenommen, daß die LDL-Präkursoren (VLDL- und IDL-Partikel) innerhalb von 24 Stunden (möglicherweise auch schneller) nach Apherese wieder zu ihren Ausgangswerten zurückkehren. Obwohl die spezifischen Kinetiken des Wiederanstiegs von VLDL- und IDL-ApoB in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, sollten die hier dargestellten Ergebnisse nicht durch kurz anhaltende Änderungen der Präkursoren beeinflusst worden sein.

In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass die FCR von LDL-ApoB bei einigen Patienten im Anschluss an eine Apherese kurzzeitig ansteigt [64]. Wenn diese Beobachtung in Modell C miteinbezogen wird, verbessert sich die Übereinstimmung (Fit) zwischen den ermittelten Daten des Modells und den beobachteten Daten nicht [Prof. Hugh Barrett, persönliche Kommunikation]. Die Werte der einzelnen Stoffwechselfparameter bleiben ebenso unverändert, aber die assoziierten Fehler nehmen zu. Daher geht die vorliegende Arbeit von konstanten FCR im Anschluss an eine LDL-Apherese aus.

In derselben Untersuchung [64] wurde festgestellt, dass die Konversion von VLDL-ApoB zu LDL-ApoB nach Apherese abnimmt. Auch wenn dieses Ergebnis nicht statistisch signifikant war, bleibt unklar, ob eine LDL-Apherese diesen Stoffwechselweg stört. Diese Beobachtung könnte

möglicherweise erklären, warum in bisher durchgeführten Studien die ermittelten Stoffwechselfparameter aus Reboundanalysen ähnlich, aber nicht identisch, zu denen aus Tracerstudien sind [66]. Hierbei gilt es allerdings zu beachten, dass diese, durch LDL-Apherese ausgelöste, Veränderung zwar die errechneten Stoffwechselfparameter beeinflussen mag, auf die jeweiligen Stoffwechselwege an sich aber aller Wahrscheinlichkeit nach keinen Einfluss hat.

Aus der bestehenden Literatur liegen Hinweise vor, dass ein bestimmter Anteil von LDL-ApoB direkt aus der Leber sezerniert werden kann [43, 63, 83]. Da unsere Modelle A - C keinen solchen Stoffwechselweg vorsehen, kann die vorliegende Studie keinen Aufschluss darüber geben, ob ein bestimmter Teil an small-dense LDL direkt und unabhängig aus der Leber sezerniert wird. Deshalb können wir in Modell C nicht unterscheiden, ob die „direkt“ gebildeten small-dense LDL-Subtypen aus der Delipidierung von VLDL/IDL-Vorläuferpartikeln stammen, oder direkt von der Leber abgegeben werden. Dennoch zeigen Daten von Patienten mit moderater Hypercholesterinämie [43], dass large-buoyant LDL-Subtypen mit intermediate-dense LDL-Subtypen kombiniert („LDL-I + LDL-II“) eng mit einer direkten LDL-Sekretion aus der Leber korrelieren. Für small-dense LDL („LDL-III“, Dichtebereich von 1.044 - 1.060 g/ml) besteht dieser Zusammenhang nicht. Folglich würde dieser Stoffwechselweg - sofern diese Ergebnisse auf Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie übertragen werden dürfen - eine eher nur untergeordnete Bedeutung für die direkte Bildung von small-dense LDL haben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Atherosklerotische Folgeerkrankungen stellen in den westlichen Industrienationen noch immer die häufigste Todesursache dar, wobei das Ausmaß und die Entwicklung einer Atherosklerose eng mit dem Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren verbunden sind.

Eine erhöhte LDL-Cholesterin-Konzentration (LDL = Low Density Lipoprotein) stellt einen wichtigen unabhängigen Risikofaktor für das Entstehen und die Progredienz einer koronaren Herzkrankheit (KHK) dar. Zudem kann durch Absenkung der LDL-Cholesterin-Konzentration die KHK-Inzidenz reduziert und bei bereits vorliegender KHK deren Fortschreiten und das Auftreten weiterer kardiovaskulärer Ereignisse verhindert werden.

Allerdings stellen die Low Density Lipoproteine (LDL) eine heterogene Gruppe von Lipoproteinen dar, die durch Dichtegradientenultrazentrifugation in large-buoyant ($d = 1.020 - 1.029$ g/ml), intermediate-dense ($d = 1.030 - 1.040$ g/ml) und small-dense ($d = 1.041 - 1.066$ g/ml) LDL subfraktioniert werden können.

In Zusammenhang mit dieser Heterogenität der LDL-Subtypen geht aus epidemiologischen Studien und in-vitro Experimenten hervor, dass nicht nur die Höhe des LDL-Cholesterin-Spiegels, sondern im speziellen auch die Art der LDL-Partikel bei der Atherogenese wichtig sind. So gelten small-dense LDL als besonders atherogen im Vergleich zu intermediate-dense LDL. Daneben gibt es aber auch Hinweise, daß large-buoyant LDL gegenüber intermediären LDL-Subtypen mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert sind.

Die Entstehung und der Metabolismus der unterschiedlichen LDL-Subtypen sind bisher allerdings nicht klar und nur ansatzweise erforscht. Dazu durchgeführte Traceruntersuchungen ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit auf ein therapeutisches Verfahren (Apherese) zurückgegriffen, um den Stoffwechsel der small-dense LDL zu charakterisieren.

Zunächst können zur Senkung des LDL-Cholesterins bei Hyperlipoproteinämien sowie zur Prävention einer KHK verschiedene Behandlungsmöglichkeiten angewendet werden (fettmodifizierte Diät, körperliche Betätigung, lipidsenkende Medikamente). Wird bei Patienten mit KHK durch maximal tolerierbare diätetische und medikamentöse Therapie dennoch keine LDL-Cholesterin-Konzentration unter 100 mg/dl erreicht, so kommt als weitere Methode die LDL-Apherese zur Behandlung der LDL-Hypercholesterinämie zur Anwendung.

Für die LDL-Apheresetherapie konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der Art des Apherese-Verfahrens, alle LDL-Subtypen abgesenkt und insbesondere small-dense LDL reduziert werden. Somit verursacht eine LDL-Apherese eine Verschiebung (Shift) im LDL-Subtypen-Dichteprofil, die am ehesten dadurch erklärt werden kann, dass der Wiederanstieg der small-dense LDL langsamer abläuft als bei den weniger dichten LDL-Subfraktionen. Diese Beobachtungen sind die Grundlage das Wiederanstiegsverhalten der einzelnen LDL-Subtypen nach erfolgter LDL-Apherese zu verwenden, um den LDL-Subtypen-Metabolismus und insbesondere die Entstehung der small-dense LDL näher zu bestimmen. Dabei basiert diese Methode auf dem Prinzip, daß im „steady-state“

befindliche Lipoproteine durch eine definierte Störung (LDL-Apherese) aus ihrem metabolischen Gleichgewicht gebracht werden. Aus der Dynamik mit welcher danach das ursprüngliche Steady-State wieder erreicht wird, können dann Rückschlüsse auf die zur Bildung benutzten Stoffwechselwege und auf metabolische Parameter (FCR, PR) gezogen werden.

Dieses Vorgehen wurde daher in der vorliegenden Arbeit angewendet, um die Stoffwechselwege der LDL-Subtypen zu untersuchen.

In der vorliegenden Studie wurde der Wiederanstieg (Rebound) der LDL-Subfraktionen nach Durchführung einer Apherese bei sieben Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie (FH), die regelmäßig mit einer LDL-Apherese therapiert werden, untersucht (58±9 Jahre, LDL-Cholesterin 342±87 mg/dl, Triglyzeride 109±39 mg/dl). Die Cholesterin- und ApoB-Konzentrationen wurden in den LDL-Subtypen direkt im Anschluss an die Apherese und an den Tagen 1, 2, 3, 5 und 7 nach Apherese gemessen.

Die LDL-Apherese verringerte die Cholesterin- und ApoB-Konzentrationen in den large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL um 66±13 und 60±12%, 68±9 und 67±5% und 69±12 und 69±11%, respektive.

Es konnte ein Shift (Verschiebung) im LDL-Subtypen-Dichteprofil beobachtet werden im Sinne einer relativen Verminderung der small-dense LDL-Subtypen gegenüber den weniger dichten intermediate-dense und large-buoyant LDL.

Nach Apherese stiegen die Cholesterin- und ApoB-Konzentrationen schneller in den large-buoyant LDL (prozentualer Anteil der Prä-

Apheresekonzentration an Tag 2: 79 ± 21 und $85\pm 16\%$) als in den intermediate-dense LDL (67 ± 9 und $70\pm 7\%$) oder small-dense LDL (64 ± 12 und $67\pm 9\%$) an.

Mithilfe von Kompartimentmodellen wurden drei Hypothesen zum Stoffwechsel von small-dense LDL überprüft: Modell A postuliert die Bildung von small-dense LDL aus der Delipidierung von large-buoyant und intermediate-dense LDL. Modell B beschreibt die direkte Entstehung von small-dense LDL aus LDL-Vorläuferpartikeln (VLDL und IDL), und Modell C geht davon aus, dass beide Stoffwechselwege kombiniert werden müssen, um den Metabolismus der small-dense LDL richtig wiederzugeben.

Allen Modellen wurde dabei zugrundegelegt, dass die Apherese selbst die fraktionelle katabolische Rate (FCR) und die Produktionsrate (PR) von ApoB nicht verändert. Weiterhin wurden für diese Analyse nur die Konzentrationsdaten von ApoB verwendet.

Das Wiederanstiegsverhalten konnte durch die Modelle B und C, nicht aber durch Modell A, beschrieben werden.

Bei Anwendung des Modells mit der besten Übereinstimmung zwischen beobachteten Konzentrationsdaten und vom Modell simulierten Daten und der größten biologischen Plausibilität (Modell C), ergaben sich für die FCR von ApoB $1.05\pm 0.86\text{ d}^{-1}$, $0.48\pm 0.11\text{ d}^{-1}$ und $0.69\pm 0.24\text{ d}^{-1}$ für die large-buoyant, intermediate-dense und small-dense LDL-Subtypen. Die Produktionsrate der small-dense LDL-Subfraktionen betrug

17.3±0.2 mg*kg⁻¹*d⁻¹. Davon stammten 56% direkt aus LDL-Vorläuferpartikeln (aus VLDL, IDL oder aus ApoB, welches direkt ins Plasma sezerniert wurde), während ein Anteil von 44% aus large-buoyant LDL und intermediate-dense LDL gebildet wurde.

Somit weisen die hier beschriebenen Daten darauf hin, dass small-dense LDL bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie aus zwei Quellen stammen. Sie entstehen zum einen durch direkte Bildung aus LDL-Vorläuferpartikeln und zum anderen aus den weniger dichten large-buoyant und intermediate-dense LDL-Subtypen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aguilar-Salinas C.A., Barrett, P.H.R., Pulai, J., Zhu, X.L., Schonfeld, G. 1997. A familial combined hyperlipidemic kindred with impaired apolipoprotein B catabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 72-82.
2. Anber, V., Griffin, B.A., Mc Connell, M., Packard, C.J., Shepherd, J. 1996. Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis* **124**: 261-271.
3. Armstrong V.W., Schleef, J., Thiery, J., Mucbe, R., Schuff-Werner, P., Eisenhauer, T., Seidel, D. 1998. Effect of HELP-LDL-apheresis on serum concentrations of human lipoprotein(a): kinetic analysis of the post-treatment return to baseline levels. *Eur. J. Clin. Invest.* **19**: 235-240.
4. Austin, M.A., Breslow, J.L., Hennekens, C.H., Buring, J.E., Willett, W.C., Krauss, R.M. 1988. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *J.A.M.A.* **260**: 1917-1921.
5. Austin, M.A., Hokanson, J.E., Brunzell, J.D. 1994. Characterization of low-density lipoprotein subclasses: methodologic approaches and clinical relevance. *Curr. Opin. Lipid.* **5**: 395-403.
6. Austin M.A., King, M., Vranizan, K.M., Krauss, R.M. 1990. Atherogenic Lipoprotein Phenotype: a proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation.* **82**: 495-506.
7. Bilheimer D.W., Grundy, S.M., Brown, M.S., Goldstein, J.L. 1983. Mevinolin and colestipol stimulate receptor-mediated clearance of low density lipoprotein from plasma in familial hypercholesterolemia heterozygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**: 4124-4128.

8. Bosch, T. 2001. Direct adsorption of lipoproteins from whole blood by DALI apheresis: technique and effects. *Ther. Apher.* **4**: 239-243.
9. Bosch, T. 1996. Lipid apheresis: from a heroic treatment to routine clinical practice. *Artif. Organs.* **20**: 414-419.
10. Bosch, T., Schmidt, B., Kleophas, W., Gillen, C., Otto, V., Passlick-Deetjen, J., Gurland, H.J. 1997. LDL-hemoperfusion - a new procedure for LDL apheresis: first clinical application of an LDL adsorber compatible with human whole blood. *Artif. Organs.* **9**: 977-982.
11. Bredie, S.J., de Bruin, T.W., Demacker, P.N., Kastelein, J.J., Stalenhoef, A.F. 1995. Comparison of gemfibrozil versus simvastatin in familial combined hyperlipidemia and effects on apolipoprotein-B-containing lipoproteins, low-density lipoprotein subfraction profile, and low-density lipoprotein oxidizability. *Am. J. Cardiol.* **75**: 348-353.
12. Brown, B.G., Albers, J.J., Fisher I.D., et al. 1990. Regression of coronary artery disease as a result of aggressive lipid lowering in men with high levels of apolipoprotein B. *N. Engl. J. Med.* **323**: 1289-1298.
13. Campos, H., Arnold, K.S., Balestra, M.E., Innerarity, T.L., Krauss, R.M. 1996. Differences in receptor binding of LDL-subfractions. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* **16**: 794-801.
14. Campos, H., Moye, L.A., Glasser, S.P., Stampfer, M.J., Sacks, F.M. 2001. Low-density lipoprotein size, pravastatin treatment, and coronary events. *J.A.M.A.* **286**: 1468-1474.
15. Campos, H., Walsh, B.W., Judge, H., Sacks, F.M. 1997. Effect of estrogen on very low density lipoprotein and low density lipoprotein subclass metabolism in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**: 3955-3963.

16. Caslake, M.J., Stewart, G., Day, S.P., Daly, E., McTaggart, F., Chapman, M.J., Durrington, P., Laggner, P., Mackness, M., Pears, J., Packard, C.J. 2003. Phenotype-dependent and-independent actions of rosuvastatin on atherogenic lipoprotein subfractions in hyperlipidaemia. *Atherosclerosis*. **171**: 245-253.
17. Chapman, M.J., Goldstein, S., Lagrange, D., Laplaud, P.M. 1981. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J. Lipid Res*. **22**: 339-358.
18. Chapman, M.J., Laplaud P.M., Luc, G., Forgez, P., Bruckert, E., Goulinet, S., Dominique, L. 1988. Further resolution of the low density lipoprotein spectrum in normal human plasma: physicochemical characteristics of discrete subspecies separated by density gradient ultracentrifugation. *J. Lipid Res*. **29**: 442-458.
19. Coresh, J., Kwiterovich, P.O., Jr., Smith, H.H., Bachorik, P.S. 1993. Association of plasma triglyceride concentration and LDL particle diameter, density, and chemical composition with premature coronary artery disease in men and women. *J. Lipid Res*. **34**: 1687-1697.
20. de Graaf, J., Hak-Lemmers, H.L., Hectors, M.P., Demacker, P.N., Hendriks, J.C., Stalenhoef, A.F. 1991. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler. Thromb*. **11**: 298-306.
21. DeJager, S., Bruckert, E., Chapman, M.J., 1993. Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. *J. Lipid Res*. **34**: 295-308.
22. Dormans, T.P.J., Swinkels, D.W., De Graaf, J., Hendriks J.C.M., Stalenhoff, A.F.H., Demacker, P.N.M. 1991. Single-spin density- gradient

ultracentrifugation vs gradient gel electrophoresis: two methods for detecting low-density-lipoprotein heterogeneity compared. *Clin. Chem.* **37**: 853-858.

23. Dreon, D.M., Fernstrom, H.A., Williams, P.T., Krauss, R.M. 1997. LDL subclass patterns and lipoprotein response to a low-fat, high-carbohydrate diet in women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 707-714.

24. Eriksson M., Berglund, L., Gabrielsson, J., Lantz, B., Angelin, B. 1993. Non-steady state kinetics of low-density lipoproteins in man-studies after plasma exchange in healthy subjects and patients with familial hypercholesterolaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* **23**: 746-752.

25. Farmer, J.A., Gotto, A.M. 1997. Dyslipidemia and other risk factors for coronary artery disease. In: *Heart Disease*. E. Braunwald, editor. Saunders, Philadelphia, PA. 1126-1160.

26. Fisher, W.R. 1972. Measurements of the molecular weight variability of plasma low density lipoproteins among normals and subjects with hyper- β -lipoproteinemia. Demonstration of macromolecular heterogeneity. *Biochemistry.* **11**: 519-525.

27. Fisher W.R., Zech, L.A., Kilgore, L.L., Stacpoole, P.W. 1991. Metabolic pathways of apolipoprotein B in heterozygous familial hypercholesterolemia: studies with a [3 H]leucine tracer. *J. Lipid Res.* **32**: 1823-1836.

28. Friedewald W.T.R., Levy, R.I., Fredrickson, D.S. 1972. Estimation of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**: 499-502.

29. Frost, R.J., Otto, C., Geiss, H.C., Schwandt, P., Parhofer, K.G. 2001. Effects of atorvastatin versus fenofibrate on lipoprotein profiles, low-density lipoprotein subfraction distribution, and hemorheologic parameters in type

- 2 diabetes mellitus with mixed hyperlipoproteinemia. *Am. J. Cardiol.* **87**: 44-48.
30. Gardner, C.D., Fortmann, S.P., Krauss, R.M. 1996. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *J.A.M.A.* **276**: 875-881.
31. Gaw A., Packard, C.J., Murray, E.F., Lindsay, G.M., Griffin, B.A., Caslake, M.J., Vallance, B.D., Lorimer, A.R., Shepherd, J. 1993. Effects of simvastatin on apoB metabolism and LDL subfraction distribution. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **13**: 170-189.
32. Geiss, H.C., Otto, C., Schwandt, P., Parhofer, K.G. 2001 Effect of atorvastatin on low-density lipoprotein subtypes in patients with different forms of hyperlipoproteinemia and control subjects. *Metabolism.* **50**: 983-988.
33. Geiss, H.C., Schwandt, P., Parhofer, K.G. 2002. Influence of simvastatin on LDL-subtypes in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia and in patients with diabetes mellitus and mixed hyperlipoproteinemia. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **110**: 182-187
34. Gnasso, A., Mancini, M. 1995. LDL-Apherese mit Dextransulfat. In *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schwandt, P., Richter, W.O. (Herausgeber). Schattauer. Stuttgart. 710-713.
35. Gordon, B.R., Saal, S.D. 1996. Low-density lipoprotein apheresis using the Liposorber dextran sulfate cellulose system for patients with hypercholesterolemia refractory to medical therapy. *J.Clin. Apheresis.* **11**: 128-131.
36. Griffin, B.A., Caslake, M.J., Yip, B., Tait, G.W., Packard, C.J., Shepherd, J. 1990. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL)

- subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis*. **83**: 59-67.
37. Griffin B.A., Freeman, D.J., Tait, G.W., Thompson, J., Caslake, M.J., Packard, C.J., Sheperd, J. 1994. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density lipoprotein (LDL) subfractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk. *Atherosclerosis*. **106**: 241-253.
38. Halle, M., Berg, A., Baumstark, M.W., König, D., Huonker, M., Keul, J. 1999. Influence of mild to moderately elevated triglycerides on low density lipoprotein subfraction concentration and composition in healthy men with low high density lipoprotein cholesterol levels. *Atherosclerosis*. **143**: 185-192.
39. Halle, M., Berg, A., Frey, I., König, D., Keul, J., Baumstark, M.W. 1995. Relationship between obesity and concentration and composition of low-density lipoprotein subfractions in normoinsulinemic men. *Metabolism*. **44**: 1384-1390.
40. Halle, M., Berg, A., Garwers, U., Baumstark, M.W., Knisel, W., Grathwohl, D., König, D., Keul, J. 1999. Influence of 4 weeks' intervention by exercise and diet on low-density lipoprotein subfractions in obese men with type 2 diabetes. *Metabolism*. **48**: 641-644.
41. Halle, M., Berg, A., König, D., Keul, J., Baumstark, M.W. 1997. Differences in the concentration and composition of low-density lipoprotein subfraction particles between sedentary and trained hypercholesterolemic men. *Metabolism*. **46**: 186-191.
42. Holvoet, P., Collen, D. 1994. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *F.A.S.E.B. J.* **8**: 1279-1284.

43. Inoue, I., Takahashi, K., Kikuchi, C., Katayama, S. 1996. LDL-apheresis reduces the susceptibility of LDL to in-vitro oxidation in a diabetic patient with hemodialysis treatment. *Diabetes Care*. **19**: 1103-1107.
44. Ito, M.K. 2002. Niacin-based therapy for dyslipidemia: past evidence and future advances. *Am.J.Manag.Care*. **8**: 315-322.
45. Kane, J.P., Malloy, M.J., Ports, T.A., et al. 1990. Regression of coronary atherosclerosis during treatment of familial combined hypercholesterolaemia with combined drug regimens. *J.A.M.A.* **264**: 3007-3012.
46. Keller, C. 2003. Indication of low-density lipoprotein apheresis in patients with severe hypercholesterolemia and its atherosclerotic vascular complications: dextran sulfate cellulose low-density lipoprotein apheresis. *Therap. Apher. Dial.* **7**: 345-349.
47. Kontopoulos, A.G., Athyros, V.G., Papageorgiou, A.A., et al. 1996. Effects of simvastatin and ciprofibrate alone and in combination on lipid profile, plasma fibrinogen, and low density lipoprotein particle structure and distribution in patients with familial combined hyperlipidaemia and coronary artery disease. *Coron. Artery Dis.* **7**: 843-850.
48. Krauss, R.M., Blanche, P.J. 1992. Detection and Quantitation of LDL subfractions. *Curr. Opin. Lipid.* **3**: 377-383.
49. Krauss, R.M., Burke, D.J. 1982. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J. Lipid Res.* **23**: 97-104.
50. Kroon, A.A., van Asten, W.N., Stalenhoef, A.F. 1996. Effect of apheresis of low-density lipoprotein on peripheral vascular disease in

hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Ann. Intern. Med.* **125**: 945-954.

51. Lamarche B., Tchernof, A., Moorjani, S., Chantin, B., Dagenais, G.R., Lupien, P.J., Despres, J.P. 1997. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. *Circulation.* **95**: 69-75.

52. La Belle, M., Krauss, R.M. 1990. Differences in carbohydrate content of low density lipoproteins associated with low density lipoprotein subclass patterns. *J. Lipid Res.* **31**: 1577-1588.

53. März, W., Baumstark, M.W., Scharnagl, H., et al. 1993. Accumulation of "small-dense" low density lipoproteins (LDL) in a homozygous patient with familial defective apolipoprotein B 100. Results from heterogenous interaction of LDL subfractions with the LDL receptor. *J. Clin. Invest.* **92**: 2922-2933.

54. März, W., Scharnagl, H., Abletshauser, C., Hoffmann, M.M., Berg, A., Keul, J., Wieland, H., Baumstark, M.W. 2001. Fluvastatin lowers atherogenic dense low-density lipoproteins in postmenopausal women with the atherogenic lipoprotein phenotype. *Circulation.* **103**: 1942-1948.

55. Mc Kenney, J.M., Mc Cormick, L.S., Schaefer, E.J., Black, D.M., Watkins, M.L., 2001. Effect of niacin and atorvastatin on lipoprotein subclasses in patients with atherogenic dyslipidemia. *Am. J. Cardiol.* **88**: 270-274.

56. Mc Namara, J.R., Campos, H., Ordovas, J.M., Peterson, J., Wilson, P.W.F., Schaefer, E.J. 1987. The effect of gender, age and lipid status on low density lipoprotein subfraction distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis.* **7**: 483-490.

57. Millar, J.S., Packard, C.J. 1998. Heterogeneity of apolipoprotein B-100-containing lipoproteins: what we have learnt from kinetic studies. *Curr. Opin. Lipid.* **9**: 197-202.
58. Morgan J.M., Capuzzi, D.M., Baksh, R.I., Intenzo, C., Carey, C.M., Reese, D., Walker, K. 2003. Effects of extended-release niacin on lipoprotein subclass distribution. *Am. J. Cardiol.* **91**: 1432-1436.
59. National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). 2002. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final Report. *Circulation.* **106**: 3143-3421.
60. Nichols, A.V., Krauss, R.M., Musliner, T.A. 1986. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. In *Methods in Enzymology. Plasma Lipoproteins, Part A. Preparation, Structure and Molecular Biology*, vol. 128. Edited by Segrest, J.P., Albers, J.J. Orlando, Florida, Academic Press. 417-431.
61. Nigon, F., Lesnik, P., Rouis, M., Chapman, M.J. 1991. Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *J. Lipid Res.* **32**: 1741-1753.
62. Otto, C., Geiss, H.C., Laubach, E., Schwandt, P. 2002. Effects of direct adsorption of lipoproteins apheresis on lipoproteins, low-density lipoprotein subtypes and hemorheology in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Ther. Apher.* **2**: 130-135.
63. Packard, C.J., Demant, T., Steward, J.P., Bedford, D., Caslake, M.J., Schwertfeger, G., Bedynek, A., Shepherd, J., Seidel, D. 2000.

Apolipoprotein B metabolism and the distribution of VLDL and LDL subfractions. *J. Lipid Res.* **41**: 305-317.

64. Parhofer, K.G., Barrett, P.H.R., Demant, T., Schwandt, P. 2000. Acute Effects of LDL-Apheresis on Metabolic Parameters of Apolipoprotein B. *J. Lipid Res.* **41**: 1596-1603.

65. Parhofer, K.G., Barrett, P.H.R., Dunn, J.L., Schonfeld, G. 1993. Effect of pravastatin on metabolic parameters of apolipoprotein B in mixed hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Invest.* **71**: 939-946.

66. Parhofer, K.G., Barrett, P.H.R., Schwandt, P. 1999. Low density lipoprotein apolipoprotein B metabolism: comparison of two methods to establish kinetic parameters. *Atherosclerosis.* **144**: 159-166.

67. Parhofer, K.G., Demant, T., Ritter, M.M., Geiss, H.C., Donner, M., Schwandt, P. 1999. Lipoprotein(a) metabolism estimated by non-steady state kinetics. *Lipids.* **34**: 325-335.

68. Rajman, I., Kendall, M.J., Cramb, R., Holder, R.L., Salih, M., Gammage, M.D. 1996. Investigation of low density lipoprotein subfractions as a coronary risk factor in normotriglyceridaemic men. *Atherosclerosis.* **125**: 231-242.

69. Richter, W.O., Donner, M.G., Schwandt, P. 1996. Short- and long-term effects on serum lipoproteins by three different techniques of apheresis. *Artif. Organs.* **20**: 311-317.

70. Richter, W.O., Donner, M.G., Schwandt, P. 1999. Three low density lipoprotein apheresis techniques in treatment of patients with hypercholesterolemia: a long-term evaluation. *Ther. Apher.* **3**: 203-208.

71. Richter, W.O., Schwandt, P. 1995. Immunapherese. In *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schwandt, P., Richter, W.O. (Herausgeber). Schattauer. Stuttgart. 682-690.
72. Ruotolo, G., Ericsson, C.G., Tettamanti, C., et al. 1998. Treatment effects on serum lipoprotein lipids, apolipoproteins and low density lipoprotein particle size and relationships of lipoprotein variables to progression of coronary artery disease in the bezafibrate coronary atherosclerosis intervention trial (BECAIT). *J.A.C.C.* **32**: 1648-1656.
73. Sacks, F.M., Campos, H. 2003. Low-density lipoprotein size and cardiovascular disease: A reappraisal. *J. Clin. Endocrin. Metab.* **88**: 4525-4532.
74. Schamberger, B.M., Geiss, H.C., Ritter, M.M., Schwandt, P., Parhofer, K.G. 2000. Influence of LDL apheresis on LDL subtypes in patients with coronary heart disease and severe hyperlipoproteinemia. *J. Lipid Res.* **41**: 727-733.
75. Schuff-Werner, P. 1995. Heparin-induzierte Extrakorporale LDL-Präzipitation (HELP). In *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schwandt, P., Richter, W.O. (Herausgeber). Schattauer. Stuttgart. 682-709.
76. Shen, M.M.S., Krauss, R.M., Lindgren F.T., et al. 1981. Heterogeneity of serum low density lipoproteins in human subjects. *J. Lipid Res.* **22**: 236-244.
77. Stampfer, M.J., Krauss, R.M., Ma, J., Blanche, P.J., Holl, L.G., Sacks, F.M., Hennekens, C.H. 1996. A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction. *J.A.M.A.* **276**: 882-888.

78. Superko, H.R., 1999. Small, dense low-density lipoprotein subclass pattern B: issues for the clinician. *Curr. Atheroscler. Rep.* **1**: 50-57.
79. Swinkels, D.W., Demacker, P.N.M., Hendriks, J.C.M., van't Laar, A., 1989. Low density lipoprotein subfractions and relationship to other risk factors for coronary artery disease in healthy individuals. *Arteriosclerosis.* **9**: 604-613.
80. Teng B., Sniderman, D., Soutar, A.K., Thompson, G.R. 1986. Metabolic basis of hyperapobetalipoproteinemia. Turnover of apolipoprotein B in low density lipoprotein and its precursors and subfractions compared with normal and familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.* **77**: 663-672.
81. Theodoraki, T.G., Tsoukatos, D.C., Karabina, S-A., et al. 2000. LDL-subfractions in patients with myocardial infarction: effect of smoking and β -blocker-treatment. *Ann. Clin. Biochem.* **37**: 313-318.
82. Thompson, G.R. 2003. LDL apheresis. *Atherosclerosis.* **167**: 1-13
83. Thompson G.R., Teng, B., Sniderman, A.D. 1987. Kinetics of LDL-subfractions. *Am. Heart J.* **113**: 514-517.
84. Tribble, D.L., Holl, L.G., Wood, P.D., Krauss, R.M. 1992. Variations in oxidative susceptibility among 6 low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis.* **93**: 189-199.
85. Vakkilainen, J., Steiner, G., Ansquer, J.C., Aubin, F., Rattier, S., Foucher, C., Hamsten, A., Taskinen, M.R., DAIS Group. 2003. Relationships between low-density lipoprotein particle size, plasma lipoproteins, and progression of coronary artery disease: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study (DAIS). *Circulation.* **107**: 1733-1737.

86. Vega, G.L., Grundy, S.M. 1986. Kinetic heterogeneity of low density lipoproteins in primary hypertriglyceridemia. *Arterioscler. Thromb.* **6**: 395-406.
87. Watts, G.F., Lewis, B., Brunt, J.N.H., et al. 1992. Effects on coronary artery disease of lipid-lowering diet, or diet plus cholestyramine, in the St. Thomas' Atherosclerosis Regression Study (STARS). *Lancet.* **339**: 563-569.
88. Watts G.F., Mandalia, S., Brunt, J.N., Slavin, B.M., Coltart, D.J., Lewis, B. 1993. Independent associations between plasma lipoprotein subfraction levels and the course of coronary artery disease in the St. Thomas' Atherosclerosis Regression Study (STARS). *Metabolism.* **42**: 1461-1467.
89. Williams, P.T., Krauss R.M., Vranizan, K.M., Albers, J.J., Terry, R.B., Wood, P.D.S. 1989. Effects of exercise-induced weight loss on low density lipoprotein subfractions in healthy men. *Arteriosclerosis.* **9**: 623-632.
90. Williams, P.T., Krauss, R.M., Vranizan, K.M., Wood, P.D. 1990. Changes in lipoprotein subfractions during diet-induced and exercise-induced weight loss in moderately overweight men. *Circulation.* **81**: 1293-1304.
91. Winkler, K., Abletshauser, C. Hoffmann, M.M., Friedrich, I., Baumstark, M.W., Wieland, H., März, W. 2002. Effect of fluvastatin slow-release on low density lipoprotein (LDL) subfractions in patients with type 2 diabetes mellitus: baseline LDL profile determines specific mode of action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**: 5485-5490.
92. Ziogas, G.G., Thomas, T.R., Harris, W.S. 1997. Exercise training, postprandial hypertriglyceridemia, and LDL subfraction distribution. *Med. Sci. Sports Exerc.* **29**: 986-991.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AIC	Akaike Information Criterion
ApoB	Apolipoprotein B
Chol	Cholesterin
DGUZ	Dichtegradientenultrazentrifugation
FCR	fraktionelle katabolische Rate/fractional catabolic rate
FH	Familiäre Hypercholesterinämie
GGE	Gradientengelelektrophorese
HDL	High Density Lipoprotein
HRT	Hormonersatztherapie/Hormon Replacement Therapy
H ₂ O bidest	zweifach destilliertes Wasser
id	intermediate-dense
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
KHK	Koronare Herzkrankheit
lb	large-buoyant
LDL	Low Density Lipoproteine
Lp(a)	Lipoprotein(a)
n	Anzahl
NLP	Normalpopulation
p	Wahrscheinlichkeit
PR	Produktionsrate/production rate
RF	Risikofaktoren
sd	small-dense
Tab.	Tabelle
TG	Triglyzeride

VLDL Very Low Density Lipoprotein

vs. versus

8. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Herrn Professor Dr. med. Burkhard Göke danken, unter dessen Leitung ich diese Arbeit an der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Großhadern fertig stellen konnte.

Des weiteren danke ich Herrn Professor Dr. med. Peter Schwandt und Herrn Professor Dr. med. Klaus Parhofer für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in den Laborräumen der Arbeitsgruppe Stoffwechsel der Medizinischen Klinik II der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Dr. med. Hans-Christian Geiss und Herrn Professor Dr. med. Klaus Parhofer gilt mein besonderer und größter Dank für die zahlreichen Anregungen, die stete Unterstützung sowie Diskussionsbereitschaft und die kontinuierliche Förderung.

Zudem danke ich Herrn Dr. med. Hans-Christian Geiss für seine Unterstützung bei der Auswahl der Patienten, der Durchführung sowie Auswertung und Diskussion der Messungen der LDL-Subtypen.

Herrn Professor Hugh Barrett möchte ich für die Hilfe bei der Berechnung der metabolischen Parameter der einzelnen Stoffwechselmodelle danken.

Weiterhin gilt den Mitarbeiterinnen des Labors der Arbeitsgruppe Stoffwechsel, und im speziellen Frau Inge Biller-Friedmann, mein ganz besonderer Dank für ihre stete und freundliche Unterstützung sowie Hilfsbereitschaft und Einweisung in die Messmethoden.

Schließlich möchte ich mich ausdrücklich bei allen Patienten für ihre Bereitwilligkeit bedanken, an dieser Studie teilzunehmen.

9. LEBENSLAUF

Angaben zur Person

Name: Sabine Carola Bremer
Geburtsdatum: 14.07.1977
Geburtsort: München

Schulbildung

1983 - 1987 Grundschule Neuried
1987 - 1996 Feodor-Lynen-Gymnasium Planegg
06/1996 Abitur

Studium

11/1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
08/1998 Physikum
08/1999 Erstes Staatsexamen
08/2001 Zweites Staatsexamen
05/2003 Drittes Staatsexamen

Praktisches Jahr

04/02 - 08/02 Tertial in Innerer Medizin
Medizinische Klinik II, Klinikum Großhadern, München
08/02 - 11/02 Tertial in Orthopädie
08/02 - 09/02 Goldcoast Hospital, Southport, University of Queensland,
Australien
09/02 - 11/02 Mona Vale Hospital, Mona Vale, University of Sydney,
Australien
11/02 - 03/03 Tertial in Chirurgie
Städtisches Krankenhaus München-Schwabing, München

Ärztin im Praktikum

02/04 - 08/04 Chirurgie
Krankenhaus Martha-Maria, München
08/04 - 02/05 Innere Medizin
Hairmyres Hospital, East Kilbride, Schottland

Assistenzärztin

02/05 - 08/05 Geriatrie
Hairmyres Hospital, East Kilbride, Schottland