

Klassische Parameter und Alternativen

Biomarker des Lipoprotein-stoffwechsels

Arnold von Eckardstein

Institut für Klinische Chemie, Universitätsspital, Zürich, Schweiz

Summary

Biomarkers of lipoprotein metabolism

The lipid status (total, HDL and LDL cholesterol [HDL-C and LDL-C], as well as triglycerides) is a key tool in estimating cardiovascular risk and defining indications and target values for lipid-lowering treatments. Due to the inaccuracy and method-dependency of HDL-C and LDL-C measurements, varying risk categories are determined for up to 20% of the population, depending upon the method used. Replacing HDL-C and LDL-C with apolipoproteins (apo) A-I and B does not significantly improve the prediction of either cardiovascular risk or therapy success. Taking into account LDL and HDL subclasses does not improve risk prediction either. HDL and LDL particle numbers (HDL-P, LDL-P) exhibit better prediction potential. Combining LDL-C with ApoB, non-HDL-C, or LDL-P seems to improve risk prediction, whereby measuring non-HDL-C in addition is most cost-effective. The functionality of HDL is an interesting concept for the discovery of new HDL biomarkers. The bioassays used help in discovering proteins and lipids, as well as their modifications, which can be employed in developing standardised quantitative assays that must be validated clinically and epidemiologically. Despite pathogenic relevance, lipoprotein(a) (Lp[a]) only marginally improves risk stratification using standard risk factors. The cut-off is also disputed: 300 mg/l vs 500 mg/l (= 80th percentiles) according to standard and more recent recommendations, respectively. The activity and concentration of lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) constitute relevant risk factors for atherosclerosis. Nonetheless, too little research has been conducted as to whether LpPLA2 improves risk prediction as compared to standard risk factors. Routine LpPLA2 measurement thus appears inappropriate. The increased clinical use of Lp(a) and LpPLA2 assays depends upon the effectiveness of new therapies directed against these proteins.

Key words: HDL; LDL; apolipoproteins; Lp(a); LpPLA2; subclasses; NMR

Einleitung

Die hauptsächlichen Indikationen für Laboruntersuchungen des Lipidstoffwechsels sind die Abschätzung und das Monitoring des kardiovaskulären Risikos. Als hierfür wesentliche Parameter werden routinemässig und, wie durch internationale Guidelines empfohlen, [1–4] die Plasma-Konzentrationen von Gesamt-, HDL- und LDL-Cholesterin sowie der

Triglyzeride bestimmt oder berechnet. Diese Parameter haben etliche analytische oder biologische Schwachpunkte, welche die Suche nach alternativen oder zusätzlichen Messgrössen stimuliert. Nach Beschreibung der Limitationen von klassischen Parametern werden im Folgenden alternative Laborparameter diskutiert. Einige von ihnen sind seit langem im klinischen Routinelabor verfügbar, nämlich die Bestimmung der Apolipoproteine (Apo) A-I und B sowie das Lipoprotein(a) (Lp[a]), oder leicht umsetzbar, nämlich die Berechnung von non-HDL-Cholesterin und Remnant-Cholesterin. Andere Parameter sind nur in Speziallaboratorien vor allem für wissenschaftliche Studien realisiert, z.B. die Bestimmung der Zahl, Grösse und Funktionalität von Lipoprotein-Partikeln und -Subklassen.

Analytische Unzuverlässigkeit von LDL- und HDL-Cholesterin

Die derzeitigen Empfehlungen und Richtlinien zur Verwendung und Interpretation von HDL-Cholesterin (HDL-C) und LDL-Cholesterin (LDL-C) in der kardiovaskulären Risikoabschätzung gehen zumeist auf Daten epidemiologischer Studien zurück, die HDL-C nach Fällung Apolipoprotein-B-haltiger Lipoproteine – also VLDL, LDL und Lp(a) – mit Dextransulfat, Heparin oder Phosphorwolframsäure bestimmt haben und das LDL-C nach der bereits im Jahre 1972 veröffentlichten Friedewald-Formel aus der Differenz von Gesamt-Cholesterin, HDL-C und dem aus der Triglyzeridkonzentration geschätzten VLDL-Cholesterin abgeleitet haben. Seit Beginn der 1990er Jahre wird für die Routine-Analytik das HDL-C mit direkten Methoden ohne Fällung bestimmt; seit Ende der 1990er Jahre sind auch direkte Methoden für die Quantifizierung des LDL-C verfügbar. Obwohl die direkten Bestimmungsmethoden für HDL- und LDL-Cholesterin seit mehr als 10 Jahren breit angewendet werden, besteht immer noch Ungewissheit über ihre Qualität und mehr noch, ob die mit ihnen erzielten Messergebnisse mit denen übereinstimmen, die in den Guidelines zugrundeliegenden epidemiologischen Studien eingesetzt wurden.

Miller und Kollegen verglichen alle kommerziell verfügbaren direkten Messmethoden für HDL- und LDL-Cholesterin mit der Referenzmethode, d.h. Bestimmung des Cholesterins (in den durch Ultrazentrifugation isolierten Lipoprotein-Fraktionen) bei 37 normolipidämischen und 138 dyslipidämischen Spendern [5]. Alle 7 Methoden erfüllten die Anforderungen des National Cholesterol Education Program (NCEP) in Bezug auf die Impräzision (<4%). Die Gesamtfehler der Bestimmungen von HDL-C und LDL-C betragen für normolipidämische Proben -13,4% bis +13,6% bzw. -13,3% bis 13,5%, für dyslipidämische Proben bei HDL-C -19,8% bis +36,3% bzw. -26,6% bis +31,9% bei LDL-C. Sechs von acht direkten HDL-C-Bestimmungsmethoden und fünf von acht direkten LDL-C-Bestimmungsmethoden erreichen die Vorgaben des NCEP für den Gesamtfehler bei normolipidämischen Proben. Keine erfüllt diese Vorgaben für dyslipidämische Methoden, wahrscheinlich wegen mangelnder Spezifität gegenüber abnormalen Lipoproteinen. Besonders ausgeprägt ist die Unrichtigkeit in hypertriglyzeridämischen Proben [6].

Deventer und Kollegen [7] verglichen die Zuverlässigkeit der Risikoklassifizierung durch direkte LDL-C-Bestimmungen, LDL-C-Schätzung nach Friedewald und non-HDL-C-Bestimmung mit der «*Center of Disease Control (CDC)*»-Referenzmethode bei 175 Personen, davon 138 mit kardiovaskulären Erkrankungen. Bei Patienten mit Triglyzeriden <2,26 mmol/l variierten im Vergleich zur Referenzmethode die Fehlklassifikationsraten zwischen 5% und 17% für das rechnerische LDL-C sowie zwischen 8% und 26% für die direkten LDL-C Bestimmungsmethoden. Nur eine von acht direkten LDL-C Bestimmungsmethoden war zuverlässiger als die Berechnung des LDL-C.

Bei Personen mit Triglyzeriden $\geq 2,26$ mmol/l aber <4,52 mmol/l war die Performance der direkten LDL-C-Bestimmungsmethoden etwas besser als die Berechnung des LDL-C.

Ob diese Fehler für die Praxis relevant sind, insbesondere im Vergleich zu den «klassischen» Methoden (Bestimmung von HDL-C nach Fällung und Berechnung von LDL-C nach der Friedewald-Formel), lässt sich am besten in epidemiologischen Studien überprüfen. Solche Analysen sind für die *Framingham-Studie* und die *Women's Health Studie* gemacht worden [8]. In der *Framingham-Studie* [8] fand sich bei 1508 Männern (darunter 173 KHK-Fälle) und 1680 Frauen (darunter 74 KHK-Fälle) eine sehr gute Übereinstimmung der direkten HDL- und LDL-Cholesterin-Bestimmungen mit der HDL-C-Bestimmung nach Fällung mit Dextransulfat/Mg²⁺ bzw. der Berechnung des LDL-C nach Friedewald. Abweichungen von mehr

als 10% fanden sich bei 7,7% für LDL-C und bei 8,5% für HDL-C. Bei den 27331 Frauen der *Women's Health Studie* fand sich ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung zwischen dem nach Friedewald errechneten LDL-C und dem direkt bestimmten LDL-C ($r = 0,976$) [9]. Sofern im Nüchternplasma bestimmt war das direkt bestimmte LDL-C im Mittel um 0,15 mmol/l niedriger als das nach Friedewald berechnete. Im Nüchternplasma waren gerechnetes und direkt bestimmtes LDL-C mit ähnlicher Hazard Ratio für kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert: 1,22 (95%-CI: 1,14–1,30) pro LDL-C-Anstieg um 1 Standardabweichung (0,90 mmol/l) versus 1,23 (95%-CI: 1,15–1,32) pro LDL-C-Anstieg um 1 Standardabweichung (0,88 mmol/l). Somit scheinen die analytischen Differenzen weniger bedeutsam für die Schätzung des relativen als des absoluten Risikos: Letzteres wird bei ca. 20% je nach Methode unterschiedlich eingeschätzt, zumeist durch die direkte Bestimmungsmethode in eine niedrigere als durch die rechnerische. Je nach Bestimmungsmethode werden bei Hochrisikopatienten potenziell die therapeutischen Ziele von LDL-C entweder nicht erreicht oder übertroffen (Letzteres scheint medizinisch kein Problem, aber kostenträchtig, wenn unnötigerweise hohe Dosierungen von Statinen oder sogar Kombinationstherapien verordnet werden).

Präanalytische Probleme der klassischen Lipid-Risikofaktoren

In der Klinik wird häufig die (Un)zuverlässigkeit von Lipidstoffwechseluntersuchungen im postprandialen Zustand diskutiert. Langsted und Nordestgaard untersuchten bei 58434 Personen (davon 2270 mit Diabetes mellitus) die Plasmakonzentrationen von Lipiden, Lipoproteinen, Apolipoproteinen und Albumin als Funktion der Zeit nach letzter Nahrungsaufnahme [10]. Ähnliche Muster fanden sich bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern: Triglyzeride blieben 6–7 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme um durchschnittlich 0,2 mmol/l erhöht, während die Konzentrationen von LDL-C und Albumin (aber nicht ApoB) bis zu 5 Stunden nach Nahrungsaufnahme sanken. Lund und Kollegen [11] verglichen drei LDL-C-Bestimmungsmethoden bei Plasmaproben von 74 Diabetikern, die nüchtern sowie 1,5 Stunden, 3 Stunden, 4,5 Stunden und 6 Stunden postprandial gewonnen wurden. Zu allen postprandialen Zeitpunkten wichen die LDL-C-Konzentrationen von denen in Nüchternproben signifikant ab und zwar im Durchschnitt um -0,36 mmol/l für die Friedewald-Methode und -0,24 mmol/l für die direkte LDL-C-Bestimmung. Bei

Frauen und Patienten mit Triglyzerid-Konzentrationen $>2,08$ mmol/l waren die postprandialen LDL-C-Unterschiede signifikant grösser. Sie betragen bis zu $0,89$ mmol/l zwischen nüchternen und postprandialen LDL-C Konzentrationen. Solch grosse Unterschiede können klinisch relevant sein.

Klinische Outcome-Studien entweder randomisiert oder mit sowohl nüchtern als auch postprandial gewonnenen Blutproben sind notwendig, um zu entscheiden, ob der prandiale Zustand die prognostische Wertigkeit von Lipidstoffwechseluntersuchungen beeinflusst. Schon jetzt sprechen Studienergebnisse dafür, dass postprandiale Triglyzeride eine engere Beziehung zum kardiovaskulären Risiko als Nüchtern-Triglyzeride haben [12]. Für die Praxis scheint zudem bei postprandial normal gefundenen Triglyzerid-Konzentrationen (<2 mmol/l) die Bewertung des Lipidstatus inklusive LDL-C vertretbar. Bei höheren Konzentrationen sollte entweder die Untersuchung in einer Nüchternprobe wiederholt werden oder das non-HDL-C anstatt des LDL-C bewertet werden.

Non-HDL-Cholesterin, Apolipoprotein B, LDL-Partikelzahl und -grösse

Die derzeitigen Empfehlungen betonen LDL-C als primäre Zielgrösse in der Behandlung von Dyslipidämien und Prävention der koronaren Herzkrankheit [1–4]. Wie zuvor beschrieben, leiden aber sowohl die direkten Messungen als auch die indirekte Friedewald-Schätzung des LDL-C unter Unrichtigkeit und Methodenabhängigkeit. Zusätzliche Ungewissheit über die Wertigkeit des LDL-C entstand durch die Ergebnisse der Statin-Studien: Einerseits wurden in vielen Studien die kardiovaskulären Ereignisraten stärker gesenkt als durch die Senkung des LDL-C erwartet. Andererseits besteht bei den Statin-behandelten Personen ein 50%-Restrisiko für ein kardiovaskuläres Ereignis. Zudem haben Nicht-Statin-Interventionen, welche das LDL-C senken (z.B. Ezitimib und Nikotinsäure), einen ungewissen kardiovaskulären Nutzen. In dieser Situation wurde immer wieder die Frage gestellt, ob non-HDL-C, ApoB oder LDL-Partikelzahl (LDL-P) das kardiovaskuläre Risiko besser erfassen als LDL-C, weil mit diesen Parametern alle potenziell atherogenen Lipoproteine, also neben LDL auch Remnants triglyzeridreicher Lipoproteine, erfasst werden.

Alle LDL-Partikel enthalten ein Molekül ApoB, aber eine variable Anzahl von Cholesterin-Molekülen. Bei gleicher LDL-C-Konzentration kann LDL-P um mehr als Faktor 2 variieren [13]. Insbesondere bei Hypertriglyzeridämie ist LDL-P grösser, als LDL-C vermuten

lässt. Auch können die therapeutischen Effekte einer lipidsenkenden Therapie deutlich grösser oder geringer sein, als durch LDL-C vermutet. So führen Statine zu einer stärkeren Absenkung von LDL-C als LDL-P. Eine grobe Abschätzung von LDL-P ist durch die Messung von ApoB möglich. Direkte Messungen von LDL-P durch Magnetresonanzspektrometrie (NMR) sind ebenfalls möglich. Diese Methode misst NMR-Signale von Methylgruppen, welche mit der Zahl von Lipoprotein-Partikeln korreliert. Wegen der eigens entwickelten Interpretationsalgorithmen war die Methode weltweit bislang nur in einigen Speziallaboratorien verfügbar, von denen sich eines – Liposcience – für die meisten Bestimmungen in klinischen Studien verantwortlich zeichnet. Nach FDA-Approval und Kommerzialisierung ist die Methode theoretisch in allen Laboren einsetzbar, so dass sich die Frage nach ihrem klinischen Nutzen vermehrt stellt. Metaanalysen von Beobachtungs- und Interventionsstudien zeigten eine ähnliche Wertigkeit von LDL-C, non-HDL-C und ApoB. In einer Metaanalyse von 26 Beobachtungsstudien mit nahezu 140 000 Teilnehmern und 12 234 Ereignissen [14] waren Änderungen der ApoB und non-HDL-C-Konzentration um 1 Standardabweichung mit nicht signifikant unterschiedlichen Hazard Ratios von 1,24 (95%-CI: 1,19–1,29) bzw. 1,27 (95%-CI: 1,22–1,33) assoziiert. In einer Metaanalyse der On-Treatment-Werte von 38 153 Patienten aus acht randomisierten kontrollierten Statin-Studien betragen die mit einer Änderung von 1 Standardabweichung assoziierten Hazard Ratios für LDL-C, non-HDL-C und ApoB: 1,13 (95%-CI: 1,10–1,17), 1,16 (95%-CI: 1,12–1,19) bzw. 1,14 (95%-CI: 1,11–1,18). Nur der geringe Unterschied zwischen LDL-C und non-HDL-C war statistisch signifikant [15]. Eine noch grössere Metaanalyse von 25 Studien bei 131 134 Patienten kam zu ähnlichen Ergebnissen: non-HDL-C war ein geringfügig besserer Prädiktor fataler und nicht-fataler kardiovaskulärer Ereignisse als ApoB [16]. Die Berücksichtigung von ApoB zusätzlich zu non-HDL-C und LDL-C führte zu einer geringfügigen Verbesserung der Risikovershersage. In der *JUPITER-Studie* unterschieden sich die standardisierten Hazard Ratios für LDL-C, non-HDL-C und ApoB nicht signifikant voneinander: 1,31 (95%-CI: 1,09–1,56), 1,25 (95%-CI: 1,04–1,50) bzw. 1,27 (95%-CI: 1,06–1,57) [17]. Interessanterweise bedingt auch die gemeinsame Berücksichtigung aller Faktoren keine wesentliche Verbesserung im Vergleich zur isolierten Betrachtung der Einzelfaktoren [14–17].

Eine Arbeitsgruppe der *American Association of Clinical Chemists (AACC)* verglich die prädiktive Wertigkeit von LDL-P und ApoB bei Daten aus 25 klinischen Studien, in denen beide Parameter gemessen wurden

[18]. Dabei verglichen die Autoren die Konkordanz- und Diskordanzraten der beiden Parameter miteinander und mit LDL-C. Bei dieser semiquantitativen Analyse kommen die Autoren zum Schluss, dass LDL-P und ApoB gleichwertig und dem LDL-C überlegen sind. Dabei geben sie ApoB wegen dessen viel breiteren Verfügbarkeit den Vorzug gegenüber LDL-P. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam die Untersuchung von über 27 000 Teilnehmerinnen der *Women's Health Study* mit über 1000 Inzidenzen während einer medianen Nachbeobachtungszeit von mehr als 17 Jahren, welche die Diskordanz- und Konkordanzraten von non-HDL-C, ApoB und LDL-P mit LDL-C verglich [19]. Mit LDL-C konkordant wurden Messwerte angesehen, wenn sie mit LDL-C übereinstimmend grösser oder kleiner als der Median waren; als diskordant, wenn die Messwerte entgegengesetzt vom Median waren. Bei Korrelationskoeffizienten von 0,910, 0,785 bzw. 0,692 betrug die Diskordanzraten von non-HDL-C, ApoB und LDL-P 11,6%, 18,9% bzw. 24,3%. Bei Frauen mit LDL-C-Konzentrationen unterhalb des Median wurde das kardiovaskuläre Risiko im Vergleich zu non-HDL-C, ApoB oder LDL-P um den Faktor 2,32–2,48 durch LDL-C unterschätzt, bei Frauen mit LDL-C-Konzentrationen oberhalb des Median um den Faktor 2,5 bis 3,0 überschätzt [19]. Alle drei Parameter zeigten eine ähnliche prognostische Qualität.

Durch Bestimmung von LDL-Subklassen mittels Gradienten-Gel-Elektrophorese (GGE), Gradienten-Ultrazentrifugation oder NMR lassen sich bis zu sechs LDL-Subklassen differenzieren. Kleine dichte LDL (sdLDL) gelten als besonders atherogen. Etliche Studien fanden signifikante Beziehungen mit KHK-Inzidenz oder -Progredienz. Allerdings gibt es keine Studienevidenz, dass LDL-Subklassen die Risikovorhersage durch Scores oder gar durch non-HDL-C, ApoB oder LDL-P verbessert. Ausserdem korrelieren die Methoden schlecht. Zum Beispiel verglich die Amsterdamer Arbeitsgruppe um John Kastelein [20] die prognostische Wertigkeit der LDL-Grössenbestimmung mittels GGE und NMR in Plasmaproben von 1025 Teilnehmern der EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition)-Norfolk-Studie, welche im Verlauf von 6 Jahren ein koronares Ereignis hatten, und 1915 Teilnehmern ohne KHK-Ereignis während derselben Nachbeobachtungszeit. Die Methoden korrelierten mit $r = 0,47$ sehr schlecht. Die Odds Ratio für spätere KHK-Ereignisse betrug für das Drittel der Teilnehmer mit den kleinsten LDL 1,35 (95%-CI: 1,12–1,63), sofern mit GGE gemessen, und 1,74 (1,41–2,15), sofern mit NMR gemessen. Wie schon in vielen anderen Studien beobachtet, verloren die kleinen LDL-Partikel nach Adjustierung

für Confounder (insbesondere Triglyzeride) ihre signifikanten Assoziationen mit KHK. Neuerdings ist auch ein automatisierbarer enzymatischer Test verfügbar, mit dem selektiv das Cholesterin in sdLDL gemessen wird. Die Wertigkeit dieses Tests wurde bei 4387 Teilnehmern der MESA-Studie im Vergleich zu LDL-C und mittels NMR bestimmter LDL-Grösse untersucht [20]. Bei univariater Analyse zeigte sdLDL-C einen stärkeren Anstieg im kardiovaskulären Risiko als LDL-C an (Odds Ratio des obersten Quartil 2,41 versus 1,75), während die mittels NMR bestimmten sdLDL keine signifikante Beziehung zum Risiko zeigte. Bei multivariater Analyse und Subgruppen-Analyse stellte sich heraus, dass sdLDL-C die Risikovorhersage nur bei nichtdiabetischen und normoglykämischen Menschen verbessert.

Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse mehr für die zusätzliche Bestimmung als für den Ersatz von LDL-C durch non-HDL-C, ApoB und LDL-P (Tab. 1). Tabelle 2 fasst die derzeitigen Empfehlungen der EAS/ESC zum Einsatz von LDL-C, non-HDL-C und ApoB zusammen [1]. Angesichts der starken Methodenabhängigkeit und der nicht von anderen Risikofaktoren unabhängigen Assoziation mit KHK ist die Bestimmung von LDL-Subklassen für keine Patientengruppe empfohlen worden [13]. Die Bestimmung von ApoB, LDL-Partikelzahl und non-HDL-C wird nur in speziellen Patientengruppen, insbesondere bei Diabetikern und Patienten mit Metabolischem Syndrom, empfohlen. Angesichts der eingeschränkten Verfügbarkeit von LDL-P kommen heute nur ApoB und non-HDL-C für den klinischen Einsatz in Frage. Die Befundung von non-HDL-C ist ohne Mehraufwand und -kosten in jedem klinischen Labor möglich. Wegen der eingeschränkten Zuverlässigkeit von

Tabelle 1: Vergleich der Performance von LDL-Cholesterin (LDL-C), non-HDL-Cholesterin (non-HDL-C), Apolipoprotein B (ApoB), LDL-Partikelzahl (LDL-P).

Kriterien	LDL-C	Non-HDL-C	ApoB	LDL-P
Methodenabhängigkeit	Ja	Ja	(Nein)	Nein
Beeinflusst durch prandialen Zustand	(Ja)	Nein	Nein	Nein
Definierte Behandlungsziele	Ja	(Ja)	(Nein)	Nein
Risikovorhersage vor lipidsenkender Therapie	Ja	Ja	Ja	Ja
Risikovorhersage unter lipidsenkender Therapie	(Nein)	Ja	Ja	Ja
Klinischer Routinetest mit kurzer Response-Zeit	Ja	Ja	(Nein)	Nein
Zusatzkosten	Nein	Nein	Ja	Ja

Tabelle 2: EAS/ESC-Empfehlungen zum Einsatz von verschiedenen Lipidparametern für Screening, Diagnostik und Monitoring des kardiovaskulären Risikos [1].

Lipidparameter	Screening	Diagnostik Stratifizierung	Behandlungs- ziele
Gesamt- cholesterin	Stark Empfohlen	Unzureichend	Nur wenn LDL-C nicht verfügbar
LDL- Cholesterin	Primär empfohlen	Primär empfohlen	Primär empfohlen
HDL- Cholesterin	Stark empfohlen	Stark empfohlen	Derzeit kein Behandlungsziel
Triglyzeride	Empfohlen	Empfohlen	Bei HTG
Non-HDL- Cholesterin	Bedenkenswert für MetS, T2DM	Bedenkenswert für MetS, T2DM	Bedenkenswert für MetS, T2DM
ApoB	Bedenkenswert für MetS, T2DM	Bedenkenswert für MetS, T2DM	Bedenkenswert für MetS, T2DM

MetS = Metabolisches Syndrom; T2DM = Diabetes mellitus Typ 2; HTG = Hypertriglyzeridämie.

HDL-C-Messungen sollte aus theoretischer Sicht ApoB gegenüber non-HDL-C vorgezogen werden. Jedoch wurden ApoB-Tests nicht so rigoros bezüglich ihrer Richtigkeit und Methodenunabhängigkeit überprüft wie die direkten LDL-C- und HDL-C-Assays [22]. Ausserdem implizieren ApoB-Messungen höhere Kosten und – wegen der Seltenheit ihrer Anforderung, häufig batch-weisen Analytik – längere Turn-around-Zeiten [23]. Somit sollte, wie von der *International Atherosclerosis Society (IAS)* empfohlen [4], non-HDL-C zusammen mit Gesamt-, HDL- und LDL-Cholesterin sowie Triglyzeriden im Lipidstatus mitberichtet werden. Tabelle 3 stellt die Zielwerte von non-HDL-C und LDL-C gegenüber.

Tabelle 3: Behandlungsziele für LDL-Cholesterin, Non-HDL-Cholesterin oder Apolipoprotein B [22].

Parameter	Sekundärprävention oder hohes Risiko
LDL-Cholesterin (mmol/l)	<1,8
Non-HDL-Cholesterin (mmol/l)	<2,6
Apolipoprotein B (g/l)	<0,8

Apolipoprotein A-I, HDL-Partikelzahl und -funktion

Fast alle epidemiologischen Studien wie auch deren Metaanalysen zeigten die von anderen Risikofaktoren unabhängige Assoziation des HDL-C mit dem kardiovaskulären Risiko [24]. So ist HDL-C auch ein fester Bestandteil von Algorithmen zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos [1–4]. Eine neue grosse Metaanalyse von randomisierten klinischen Studien zeigte, dass auch unter Statin-Therapie und maximaler Senkung des LDL-C, HDL-C ein guter Prädiktor neuer kardiovaskulärer Ereignisse ist [25]. Allerdings

gibt es auch mehrere Beispiele neuerer Studien bei Patienten mit KHK oder ACS, bei denen HDL-C nicht prädiktiv war [26, 27]. Bei mehr als 12 000 koronarangiographierten Teilnehmern der *LURIC*-, *AtheroGene*- und *ESTHER-Studien* war HDL-C nur bei Patienten ohne nachgewiesene KHK signifikant mit kardiovaskulärer Mortalität assoziiert. Bei Patienten mit stabiler oder akuter KHK bei der Basisuntersuchung war die Beziehung nicht signifikant [27]. Bislang ist nicht bekannt, warum die bislang recht robuste Assoziation des HDL-C mit dem kardiovaskulären Risiko bei Patienten mit vorbestehender KHK nicht mehr besteht. Mögliche Erklärungen sind Methoden-Änderungen der HDL-C-Bestimmung oder der Einsatz von Medikamenten, welche mit der HDL-Wirkung interferieren, z.B. Statine oder Plättchenhemmer.

Trotz der inversen Assoziation und trotz der vielen potenziell anti-atherogenen Funktionen von HDL, ist die Kausalität der Beziehung zwischen HDL-C und KHK umstrittener denn je, nachdem die Behandlung von 15 871 Patienten mit Statinen plus Plazebo oder Dalcetrapib, einem Hemmer des Cholesterinestertransferproteins, keinen Nutzen für Dalcetrapib zeigte, obwohl es das HDL-C um ca. 30% erhöhte [26]. Auch eine grosse Mendel'sche Randomisierungsstudie fand keinen statistischen signifikanten Zusammenhang zwischen genetisch bedingten Veränderungen der HDL-C-Konzentration und kardiovaskulärem Risiko [28]. Die Widersprüche dieser Ergebnisse werden heute zumeist mit zwei Modellen erklärt: Die Protagonisten des einen Modells nehmen an, dass HDL keine kausale Beziehung zur Atherosklerose haben und dass die epidemiologische Beziehung nur Ausdruck eines Confoundings des niedrigen HDL-C mit anderen Risikofaktoren ist, vor allem dem Vorhandensein von Remnants triglyzeridreicher Lipoproteine [12]. Die Protagonisten des anderen Modells stellen klar, dass das im klinischen Labor gemessene Cholesterin der HDL nicht das anti-atherogene Agens ist und auch nicht die Menge des aus der atherosklerotischen Plaque rücktransportierten Cholesterins repräsentiert [29–31]. Vielmehr sind HDL strukturell und funktionell heterogene Lipoproteine, die viele biologisch aktive Moleküle enthalten und zudem durch pathogene Prozesse qualitativ und quantitativ unabhängig von der Menge HDL-Cholesterin modifiziert werden [30, 31]. Zum Beweis des letzteren Modells und letztlich zu Verbesserung der Aussagekraft von HDL-Cholesterin insbesondere unter Behandlung werden neue Biomarker gesucht. Ein offensichtlicher Marker-Kandidat ist Apolipoprotein A-I (ApoA-I), das anders als Cholesterin viele biologische Funktionen der HDL ausübt. In einer Meta-

analyse von bevölkerungsbasierten Beobachtungsstudien [22] betrug die standardisierten Hazard Ratios von HDL-C und ApoA-I 0,83 zu anderen Risikofaktoren inklusive HDL-C eine geringfügige Verbesserung der Risikovorhersage [14], möglicherweise weil das HDL-C/ApoA-I-Verhältnis eine Schätzgröße der HDL-Größe ist [32]. Auch in der Metaanalyse klinischer Studien zeigten HDL-C und ApoA-I ähnlich gute prognostische Leistungen. Allerdings waren unter Statin-Therapie Ein-Jahres-Änderungen der ApoA-I-Konzentration, aber nicht der HDL-C-Konzentration prädiktiv [33].

Eine weitere Alternative ist die Messung von HDL-Subklassen oder HDL-Partikelzahl (HDL-P). Allerdings werden durch unterschiedliche Trennmethode (Ultrazentrifugation, Gel-Filtration, Gradienten-Gel-Elektrophorese, Agarose-Gel-Elektrophorese, NMR) unterschiedliche Subklassen beschrieben. Bislang war schon allein die Kommunikation über HDL-Subklassen schwierig, weil die unterschiedlichen Trennmethode unterschiedliche Klassifikationen implizierten. Eine Gruppe von HDL-Forschern hat kürzlich die unterschiedlichen Methoden gegenübergestellt und eine übergeordnete Nomenklatur mit folgenden physikochemischen Subklassen vorgeschlagen: very large HDL (VL-HDL), large HDL (L-HDL), medium HDL (M-HDL), small HDL (S-HDL) und very-small HDL (VS-HDL) inklusive der pre- β -1-HDL-Subklasse, welche essentiell für den Cholesterin-Efflux aus Makrophagen ist [34]. Von der einheitlichen Nomenklatur versprechen sich die Autoren nicht nur eine bessere Vergleichbarkeit von Forschungsergebnissen, sondern auch der Wirksamkeit von verschiedenen therapeutischen Interventionen auf Struktur, Stoffwechsel und Funktion der HDL und schliesslich auch die kardiovaskuläre Risiko-Prädiktion. In zwei Studien waren die Assoziationen der mittels NMR bestimmten HDL-Partikelzahl (HDL-P) zur Karotis-Intima-Media-Dicke und zum Eintritt kardiovaskulärer Ereignisse enger als die von HDL-C oder ApoA-I [35, 36].

In mehreren kleinen Fall-Kontroll-Studien zeigten verschiedene Laboratorien, dass sich die HDL von Patienten mit Diabetes, KHK, chronischer Niereninsuffizienz oder anderen entzündlichen Krankheiten funktionell von HDL Gesunder unterscheiden, z.B. in der Fähigkeit, Cholesterin-Efflux aus Makrophagen auszulösen, endotheliale NO-Synthase zu stimulieren oder Apoptose zu hemmen [30, 31]. Diese Bioassays sind nicht für die klinische Routineanalytik tauglich, aber wertvolle Instrumente, um funktionell relevante Komponenten oder Molekülveränderungen zu identifizieren, die mit routinetauglichen Methoden quantifiziert werden können. Ein möglicherweise erfolgreiches Beispiel für diese Strategie

ist die Identifizierung von ApoC-III als proapoptisches Molekül in HDL, das in HDL von KHK-Patienten angereichert ist [37]. Parallel zu dieser Entdeckung veröffentlichten Jensen und Kollegen die Ergebnisse zweier «*nested-case-control*»-Analysen von Teilnehmern der *Physicians Health and Nurses Health Studies*, wonach die Differenzierung von ApoC-III-haltigen und -freien HDL [38] die prädiktive Wertigkeit des HDL-C verbesserte: Die Cholesterin-Konzentration in ApoC-III-haltigen HDL, welche etwa 10–15% der HDL-Partikel ausmachen, hatten eine positive statt inverse Beziehung zu KHK-Ereignissen: Die standardisierten Hazard Ratios betrug 0,66 (95%-CI: 0,53–0,93) für HDL-C in ApoC-III-freien Partikeln aber 1,18 (95%-CI: 1,03–1,34) für HDL-C in ApoC-III-haltigen Partikeln [38]. Insgesamt mehren sich die Hinweise, dass ApoC-III ein relevantes Protein für die Atherosklerose ist: ApoC-III-Konzentrationen in HDL oder ApoB-haltigen Lipoproteinen sind mit dem kardiovaskulären Risiko assoziiert [39]. ApoC-III-Mutationen, die mit einer Prävalenz von etwa 1% in der Bevölkerung vorkommen, sind mit niedrigeren Konzentrationen von Triglyzeriden und höheren Konzentrationen HDL-C sowie einem verminderten kardiovaskulären Risiko assoziiert [40, 41]. Tatsächlich befindet sich derzeit eine gegen ApoC-III gerichtete antisense-RNA-Therapie in der klinischen Entwicklung [42].

Triglyzeride und Remnant-Cholesterin

Die Rolle der Triglyzeride als unabhängiger Risikofaktor ist umstritten, weil es nur in univariaten Analysen eine robuste Beziehung zum kardiovaskulären Risiko hat. Bei multivariater Analyse ist die Triglyzerid-Konzentration meistens kein unabhängiger Risikofaktor. In den bereits zuvor diskutierten Metaanalysen haben die Triglyzeride auch nicht die Risikovorhersage von Algorithmen verbessert [14]. Diese Analysen wurden zumeist in Studien gemacht, die Nüchternblutproben massen. Postprandiale Triglyzeride scheinen eine engere Beziehung zum kardiovaskulären Risiko zu haben [12].

Das Fehlen statistischer Unabhängigkeit besagt aber nicht, dass Triglyzeride kein kausaler und damit behandelbarer Risikofaktor sind. Zwar gibt es wie für HDL-C keine Evidenz aus randomisierten Interventionsstudien für eine kausale Beziehung von Triglyzeriden zur Atherosklerose. Mit Ausnahme der CETP-Inhibitoren führten alle die HDL-C-Konzentration erhöhenden Medikamente (Fibrate, Nikotinsäure) auch zu einer Absenkung der Triglyzeride. Und auch Omega-3-Fettsäuren, die Triglyzeride senken, ohne

HDL-C zu erhöhen, sind laut Metaanalysen nicht wirksam bei der Senkung des kardiovaskulären Risikos. Allerdings weisen Mendel-Randomisierungsexperimente auf eine kausale Beziehung [12]. In der *Copenhagen City Heart Study* waren sowohl die postprandiale Triglyzerid-Konzentration als auch genetische Polymorphismen mit Einfluss auf die Triglyzerid-Konzentration mit dem Risiko für Herzinfarkt assoziiert [12, 43]. Wahrscheinlich sind aber nicht die Triglyzeride per se, sondern die Remnants triglyzeridreicher Lipoproteine proatherogen. Zur gängigeren Beschreibung dieses Zusammenhangs haben Nordestgaard und Kollegen den Parameter Remnant-Cholesterin geprägt.

Der Begriff «Remnant-Cholesterin» beschreibt die Konzentration des Cholesterins in den triglyzeridreichen Lipoproteinen, d.h. in Very-low-density-Lipoproteinen (VLDL) und Intermediate-Lipoproteinen (IDL) des Nüchternplasmas sowie in diesen Lipoproteinen plus Chylomikronen im postprandialen Plasma. Nordestgaard und Mitarbeiter schlagen vor, diese Konzentration abzuschätzen, in dem man die Differenz von Gesamt-C – HDL-C minus LDL-C – berechnet, wobei LDL-C nach der Friedewald-Formel berechnet wird, wenn die Triglyzeride $<4,6$ mmol/l betragen, und bei höheren Triglyzerid-Konzentrationen gemessen [12, 43]. Bei dieser Definition korreliert die Konzentration des Remnant-Cholesterins sehr eng mit der Triglyzerid-Konzentration, nämlich mit einem r^2 von 96%. Dies ist nicht verwunderlich, weil bei Triglyzeriden $<4,6$ mmol/l die Remnant-Cholesterin-Konzentration dem Faktor Triglyzeride/2,22 in der Friedewald-Formel entspricht. Das Konzept des Remnant-Cholesterins ist zwar aus pathogenetischer Sicht vernünftig. Die Berechnung des Remnant-Cholesterins vertuscht aber, dass es sich hier in der Regel (bei Triglyzeriden $<4,6$ mmol/l) um eine direkt von der Triglyzerid-Konzentration abgeleitete und damit nicht um eine neue Messgrösse handelt. Der Beweis des Remnant-Konzepts erfordert also die Verfügbarkeit robuster Assays, welche direkt die Konzentration von Remnants quantifizieren.

Lipoprotein(a)

Lipoprotein(a) (Lp[a]), ist ein LDL-ähnliches Lipoprotein, was sich von diesem durch die zusätzliche Anwesenheit von Apolipoprotein(a) (Apo[a]), unterscheidet. Dieses ähnelt durch das Vorhandensein einer Kringle-V-Domäne und einer allerdings inaktiven Protease-Domäne sowie einer variablen Anzahl von Kringle-IV-Domänen dem Plasminogen, aus dessen Gen es wohl auch durch Duplikationen hervorging. Die Konzentration des Lp(a) ist stark genetisch deter-

miniert, wobei die Anzahl von Kringle-IV-Domänen invers mit der Lp(a)-Konzentration korreliert. Seit mehreren Jahrzehnten ist in vielen klinischen und epidemiologischen Studien die unabhängige Assoziation von Lp(a) mit einem erhöhten Risiko für KHK dokumentiert worden [44, 45]. In einer Metaanalyse von 24 Studien mit 133 500 Teilnehmern und 12 639 Koronar-Ereignissen betrug die standardisierte Hazard Ratio 1,13 (95%-CI: 1,09–1,18) und war damit ähnlich hoch wie die standardisierten Hazard Ratios von Gesamtcholesterin (1,19 [95%-CI: 1,15–1,24]) oder Triglyzeriden (1,18 [95%-CI: 1,14–1,22]) [14]. Allerdings unterschätzt diese Hazard Ratio das mit Lp(a) assoziierte Risiko, weil die Beziehung nicht linear ist, sondern erst in der obersten Quartile oder Quintile bzw. bei Konzentrationen >300 mg/l erhöht ist [46–48].

Die genomweiten Assoziationsstudien haben den LPA-Locus als einen der stärksten genetischen Faktoren für die KHK nachgewiesen. Da Polymorphismen dieses Locus auch die Lp(a)-Konzentration determinieren, ist die kausale Beziehung von Lp(a) zur Atherosklerose unstrittig [44, 45]. Diese Mendel-Randomisierungsstrategie wurde auch ausgenutzt, um die Robustheit und Kausalität der Assoziationen von Lp(a) mit anderen Gefässkrankheiten zu testen. So wurde in verschiedenen früheren Studien gezeigt, dass Lp(a) auch das Risiko für venöse Thrombosen erhöht. Diese Beziehung erscheint wegen der Strukturhomologie von Apo(a) und Plasminogen und wegen einiger experimenteller Ergebnisse biologisch plausibel. In einer grossen dänischen Studie fand sich aber keine Assoziation zwischen Lp(a)-Konzentration, Kringle-IV-Polymorphismen und dem Risiko venöser thromboembolischer Ereignisse [48]. Im Gegensatz hierzu hatten sowohl Lp(a)-Konzentration als auch LPA-Polymorphismen signifikante Beziehungen zum Risiko von Herzinfarkt und zum Ausmass von Stenosen in koronaren und femoralen Arterien sowie in den Karotiden [48]. Analoge Ergebnisse wurden in einer Metaanalyse von 35 Fall-Kontroll-Studien von Patienten mit Schlaganfall ($n = 9396$), peripherer arterieller Verschlusskrankheit ($n = 5215$), abdominalen Aortenaneurysma ($n = 4572$), venöser Thromboembolie ($n = 4607$), intrakraniell Aneurysma ($n = 1328$) oder KHK ($n = 12716$) gefunden: Ischämischer Schlaganfall wegen des Verschlusses grosser Gefässe, periphere arterielle Verschlusskrankheit, KHK und interessanterweise auch abdominales Aortenaneurysma waren mit Lp(a) und LPA-Polymorphismen assoziiert, aber nicht venöse Thromboembolie und intrakranielles Aneurysma [49]. Interessanterweise wurde der LPA-Locus vor kurzem auch mit Herzklappenverkalkung und Aortenstenose assoziiert [50].

Leider lässt sich die Lp(a)-Konzentration therapeutisch nur schlecht beeinflussen. Die Nikotinsäure ermöglicht eine Senkung der Lp(a)-Konzentration um ca. 30%, verbesserte aber in zwei Studien nicht die Wirksamkeit der Statine auf die Vermeidung koronarer Ereignisse [51, 52]. Interessanterweise senken auch die CETP-Inhibitoren Anacetrapib und Evacetrapib [53, 54] sowie die PCSK9-Inhibitoren Evolocumab und Alirocumab die Lp(a)-Konzentration [55, 56], so dass sich hierdurch neben der HDL-Cholesterin-Erhöhung bzw. der LDL-Cholesterin-Senkung eine weitere Motivation für die Entwicklung dieser Medikamentengruppe ergibt. Leider sind die zugrundeliegenden Pathomechanismen unbekannt, so dass auch auf der Effektor-Seite des Lp(a) keine Therapiemöglichkeit bekannt ist [44, 45]. Die oben dargestellten Ergebnisse der Studien zum LPA-Polymorphismus verdeutlichen allerdings, dass eher anti-atherogene und anti-thrombotische Strategien zum Erfolg führen werden.

Das von Lp(a) transportierte Cholesterin ist Teil des LDL-C. Weil Lp(a) nicht durch Statine gesenkt wird, begrenzt sogar der durch Lp(a) transportierte Anteil des LDL-C die Effektivität der Statine auf die LDL-C-Senkung. In einer Metaanalyse von drei Atorvastatin-Studien war der LPA-Locus mit Variationen in der Statin-Response assoziiert. Trotz eingeschränkter LDL-C-Senkung wurden aber KHK-Ereignisse in Patienten mit tiefen oder hohen Lp(a)-Konzentrationen gleichermassen durch Statine gesenkt [57].

Leider hat sich die Bestimmung des Lp(a) trotz der immer klareren Risikobeziehungen klinisch nicht durchgesetzt, unter anderem weil es therapeutisch nicht beeinflussbar ist, zumindest nicht mit bekannter Relevanz für das klinische Outcome. Leider verbessert Lp(a) die Risikostratifizierung durch klassische Risikofaktoren nur unwesentlich. Auch ist der Cut-off umstritten, 300 mg/l laut traditioneller Empfehlungen, 500 mg/l (= 80. Perzentile) aufgrund neuerer Empfehlungen [58]. Angesichts der unsicheren klinischen Relevanz wurde explizit von der Bestimmung des Lp(a) als nicht kosteneffektiv abgeraten [59].

Lipoprotein-assoziierte Phospholipase A2 (LpPLA2)

Die Lipoprotein-assoziierte Phospholipase A2 (LpPLA2 = Plättchen-aktivierender Faktor Acylhydrolase = PAF-AH) ist ein inflammatorisches Enzym, das unter anderem in atherosklerotischen Plaques exprimiert ist. In mehreren epidemiologischen Studien wurden sowohl die Konzentration als auch die Aktivität von LpPLA2 positiv mit dem koronaren Risiko assoziiert. LpPLA2-hemmende Medikamente werden gegenwär-

tig klinisch erprobt, um Atherosklerose zu verhüten oder zu therapieren. Die *Emerging Risk Factor Collaboration Group* führte vor kurzem eine Metaanalyse der Originaldaten von 32 prospektiven Studien mit 79 036 Teilnehmern und 17 722 fatalen oder nicht-fatalen Ereignissen während 474 976 Personen-Jahren durch [60]. Nach Adjustierung für konventionelle Risikofaktoren waren Änderungen der LpPLA2-Aktivität und -Konzentration um 1 Standardabweichung mit einer Hazard Ratio von 1,10 (95%-CI: 1,05–1,16) bzw. 1,11 (95%-CI: 1,07–1,16) für KHK assoziiert. Ähnliche Hazard Ratios fanden sich für Schlaganfall, vaskuläre und nicht-vaskuläre Mortalität. Damit sind LpPLA2-Aktivität und -Konzentration in ähnlicher Grössenordnung wie non-HDL-C oder Blutdruck mit dem kardiovaskulären Risiko assoziiert. In einer neueren Metaanalyse von 11 Studien mit 32 075 Teilnehmern und 6150 KHK-Ereignissen wurden die Assoziationen bestätigt. Die Risikovorhersage mittels multipler klassischer Risikofaktoren wird durch die LpPLA2-Konzentration, aber nicht durch die LpPLA2-Aktivität verbessert [14]. Dieser Befund wurde in einer «nested case-control»-Auswertung innerhalb der *Women's Health Initiative Observational Study* bestätigt [61].

Die *JUPITER*- und *MIRACL*-Studien untersuchten die Effekte der Statin-Therapie auf LpPLA2-Konzentration und -Aktivität sowie deren Assoziationen mit kardiovaskulären Ereignissen [62, 63]. Sowohl Rosuvastatin als auch Atorvastatin führten zu einer Senkung von LpPLA2-Konzentration und -Aktivität um ca. 30%. LpPLA2-Konzentration (aber nicht Aktivität) war in der Placebogruppe der *JUPITER*-Studie mit dem koronaren Risiko assoziiert. Unter Statin-Therapie fand sich in keiner Studie eine signifikante Assoziation mit kardiovaskulären Endpunkten [62, 63].

Die Aktivität und Konzentration von LpPLA2 sind mit dem kardiovaskulären Risiko assoziiert, womöglich aber nur bei Patienten ohne Statin-Therapie. Zudem verbessert LpPLA2 die Risikovorhersage klassischer Risikofaktoren, wenn überhaupt, nur marginal. Insofern wird die Messung von LpPLA2 in der Klinik derzeit nicht empfohlen [59]. Der fehlende therapeutische Nutzen des LpPLA2-Hemmers Darapladib in Bezug auf Verhütung kardiovaskulärer Ereignisse [64, 65] macht den klinischen Nutzen von LpPLA2-Bestimmungen eher unwahrscheinlicher.

Funding / potential competing interests:

Der Autor deklariert Honorare für Vorträge und Beratungen von Amgen, Sanofi-Aventis, Astra Zeneca, und Merck Sharp & Dohme.

References

– The full list of references is attached to the online version at www.cardiovascmed.ch.

Correspondence:
Professor Arnold von
Eckardstein, MD
Institut für Klinische
Chemie
Universitätsspital Zürich
Rämistrasse 100
CH-8091 Zürich
Switzerland
[arnold.voneckardstein\[at\]
usz.ch](mailto:arnold.voneckardstein[at]usz.ch)

References

- Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*. 2011;32:1769–818.
- Perk J, De Backer G, Gohlke H, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*. 2012;33:1635–701.
- Stone NJ, Robinson J, Lichtenstein AH, et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* oder *JACC* in press 2014.
- Expert Panel on Dyslipidemia. An International Atherosclerosis Society Position Paper: Global recommendations for the management of dyslipidemia: Executive summary. *Atherosclerosis*. 2014;232(2):410–3. *Order J Clin Lipidol*. 2013;7(6):561–5.
- Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, Bachmann LM, Caudill SP, Dziekonski A, et al. Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. *Clin Chem*. 2010;56(6):977–86.
- Langlois MR, Descamps OS, van der Laarse A, Weykamp C, Baum H, Pulkki K, et al.; EAS-EFLM Collaborative Project. Clinical impact of direct HDLc and LDLc method bias in hypertriglyceridemia. A simulation study of the EAS-EFLM Collaborative Project Group. *Atherosclerosis*. 2014;233(1):83–90.
- van Deventer HE, Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, Bachmann LM, Caudill SP, et al. Non-HDL cholesterol shows improved accuracy for cardiovascular risk score classification compared to direct or calculated LDL cholesterol in a dyslipidemic population. *Clin Chem*. 2011;57(3):490–501.
- Otokoza S, Ai M, Asztalos BF, White CC, Demissie-Banjaw S, Cupples LA, et al. Direct assessment of plasma low density lipoprotein and high density lipoprotein cholesterol levels and coronary heart disease: results from the Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis*. 2010;213(1):251–5.
- Mora S, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Comparison of LDL cholesterol concentrations by Friedewald Calculation and direct measurement in relation to cardiovascular events in 27331 women. *Clin Chem*. 2009;55:888–94.
- Langsted A, Nordestgaard BG. Nonfasting Lipids, Lipoproteins, and Apolipoproteins in Individuals With and Without Diabetes: 58 434 Individuals from the Copenhagen General Population Study. *Clin Chem*. 2011;57(3):482–9.
- Lund SS, Petersen M, Frandsen M, Smidt UM, Parving HH, Vaag AA, et al. Agreement between fasting and postprandial LDL cholesterol measured with 3 methods in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem*. 2011 Feb;57(2):298–308. Epub 2010 Oct 14. Erratum in: *Clin Chem*. 2011;57(5):782.
- Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(4):427–36.
- Davidson MH, Ballantyne CM, Jacobson TA, Bittner VA, Braun LT, Brown AS, et al. Clinical utility of inflammatory markers and advanced lipoprotein testing: advice from an expert panel of lipid specialists. *J Clin Lipidol*. 2011;5(5):338–67.
- Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Gao P, Pennells L, Kaptoge S, Caslake M, Thompson A, et al. Lipid-related markers and cardiovascular disease prediction. *JAMA*. 2012;307(23):2499–506.
- Boekholdt SM, Arsenault BJ, Mora S, Pedersen TR, LaRosa JC, Nestel PJ, et al. Association of LDL cholesterol, non-HDL cholesterol, and apolipoprotein B levels with risk of cardiovascular events among patients treated with statins: a meta-analysis. *JAMA*. 2012;307(12):1302–9.
- Robinson JG, Wang S, Jacobson TA. Meta-analysis of comparison of effectiveness of lowering apolipoprotein B versus low-density lipoprotein cholesterol and nonhigh-density lipoprotein cholesterol for cardiovascular risk reduction in randomized trials. *Am J Cardiol*. 2012;110(10):1468–76.
- Mora S, Glynn RJ, Boekholdt SM, Nordestgaard BG, Kastelein JJ, Ridker PM. On-treatment non-high-density lipoprotein cholesterol, apolipoprotein B, triglycerides, and lipid ratios in relation to residual vascular risk after treatment with potent statin therapy: JUPITER (justification for the use of statins in prevention: an intervention trial evaluating rosuvastatin). *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(17):1521–8.
- AACC Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices, Cole TG, Contois JH, Csako G, McConnell JP, Remaley AT, Devaraj S, Hoefner DM, Mallory T, Sethi AA, Warnick GR. Association of apolipoprotein B and nuclear magnetic resonance spectroscopy-derived LDL particle number with outcomes in 25 clinical studies: assessment by the AACC Lipoprotein and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. *Clin Chem*. 2013;59(5):752–70.
- Mora S, Buring JE, Ridker PM. Discordance of Low-Density Lipoprotein (LDL) Cholesterol With Alternative LDL-Related Measures and Future Coronary Events. *Circulation*. 2014;129(5):553–61.
- Arsenault BJ, Lemieux I, Després JP, Wareham NJ, Stroes ES, Kastelein JJ, et al. Comparison between gradient gel electrophoresis and nuclear magnetic resonance spectroscopy in estimating coronary heart disease risk associated with LDL and HDL particle size. *Clin Chem*. 2010;56(5):789–98.
- Tsai MY, Steffen BT, Guan W, McClelland RL, Warnick R, McConnell J, et al. New automated assay of small dense low-density lipoprotein cholesterol identifies risk of coronary heart disease: the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(1):196–201.
- Contois JH, Warnick GR, Sniderman AD. Reliability of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B measurement. *J Clin Lipidol*. 2011;5(4):264–72.
- Ramjee V, Sperling LS, Jacobson TA. Non-high-density lipoprotein cholesterol versus apolipoprotein B in cardiovascular risk stratification: do the math. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(5):457–63.
- Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA*. 2009;302:1993–2000.
- Boekholdt SM, Arsenault BJ, Hovingh GK, Mora S, Pedersen TR, Larosa JC, et al. Levels and changes of HDL cholesterol and apolipoprotein A-I in relation to risk of cardiovascular events among statin-treated patients: a meta-analysis. *Circulation*. 2013;128(14):1504–12.
- Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, et al.; dal-OUTCOMES Investigators. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2012;367(22):2089–99.
- Silbernagel G, Schöttker B, Appelbaum S, Scharnagl H, Kleber ME, Grammer TB, et al. High-density lipoprotein cholesterol, coronary artery disease, and cardiovascular mortality. *Eur Heart J*. 2013;34(46):3563–71.

- 28 Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet*. 2012;380(9841):572–80.
- 29 Rosenson RS, Brewer HB Jr, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*. 2012;125(15):1905–19.
- 30 Rosenson RS, Brewer HB Jr, Ansell B, Barter P, Chapman MJ, Heinecke JW, et al. Translation of high-density lipoprotein function into clinical practice: current prospects and future challenges. *Circulation*. 2013;128(11):1256–67.
- 31 Annema W, von Eckardstein A. High-density lipoproteins. Multifunctional but vulnerable protections from atherosclerosis. *Circ J*. 2013;77(10):2432–48.
- 32 Mazer NA, Giulianini F, Paynter NP, Jordan P, Mora S. A comparison of the theoretical relationship between HDL size and the ratio of HDL cholesterol to apolipoprotein A-I with experimental results from the Women's Health Study. *Clin Chem*. 2013;59(6):949–58.
- 33 Boekholdt SM, Arsenault BJ, Hovingh GK, Mora S, Pedersen TR, Larosa JC, et al. Levels and changes of HDL cholesterol and apolipoprotein A-I in relation to risk of cardiovascular events among statin-treated patients: a meta-analysis. *Circulation*. 2013;128(14):1504–12.
- 34 Rosenson RS, Brewer HB Jr, Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, Kontush A, et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem*. 2011;57(3):392–410.
- 35 Mackey RH, Greenland P, Goff DC Jr, Lloyd-Jones D, Sibley CT, Mora S. High-density lipoprotein cholesterol and particle concentrations, carotid atherosclerosis, and coronary events: MESA (multi-ethnic study of atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(6):508–16.
- 36 Mora S, Glynn RJ, Ridker PM. High-density lipoprotein cholesterol, size, particle number, and residual vascular risk after potent statin therapy. *Circulation*. 2013;128(11):1189–97.
- 37 Riwanto M, Rohrer L, Roschitzki B, Besler C, Mocharla P, Mueller M, et al. Altered activation of endothelial anti- and pro-apoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: Role of HDL-proteome remodeling. *Circulation* 2013;127(8):891–904
- 38 Jensen MK, Rimm EB, Furtado JD, Sacks FM. Apolipoprotein C-III as a Potential Modulator of the Association Between HDL-Cholesterol and Incident Coronary Heart Disease. *J Am Heart Assoc*. 2012;1(2). doi:pil: jah3-e000232.
- 39 Sacks FM, Alaupovic P, Moye LA, Cole TG, Sussex B, Stampfer MJ, et al. VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation*. 2000;102:1886–92.
- 40 Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N Engl J Med*. 2014;371(1):32–41.
- 41 TG and HDL Working Group of the Exome Sequencing Project. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med*. 2014;371(1):22–31.
- 42 Graham MJ, Lee RG, Bell TA 3rd, Fu W, Mullick AE, Alexander VJ, et al. Antisense oligonucleotide inhibition of apolipoprotein C-III reduces plasma triglycerides in rodents, nonhuman primates, and humans. *Circ Res*. 2013;112(11):1479–90.
- 43 Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, West AS, Grande P, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Genetically elevated non-fasting triglycerides and calculated remnant cholesterol as causal risk factors for myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2013;34(24):1826–33.
- 44 Tsimikas S, Hall JL. Lipoprotein(a) as a potential causal genetic risk factor of cardiovascular disease: a rationale for increased efforts to understand its pathophysiology and develop targeted therapies. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(8):716–21.
- 45 Dubé JB, Boffa MB, Hegele RA, Koschinsky ML. Lipoprotein(a): more interesting than ever after 50 years. *Curr Opin Lipidol*. 2012;23(2):133–40.
- 46 Gurdasani D, Sjouke B, Tsimikas S, Hovingh GK, Luben RN, Wainwright NW, et al. Lipoprotein(a) and risk of coronary, cerebrovascular, and peripheral artery disease: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(12):3058–65.
- 47 Virani SS, Brautbar A, Davis BC, Nambi V, Hoogeveen RC, Sharrett AR, et al. Associations between lipoprotein(a) levels and cardiovascular outcomes in black and white subjects: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation*. 2012;125(2):241–9.
- 48 Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Genetic evidence that lipoprotein(a) associates with atherosclerotic stenosis rather than venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(7):1732–41.
- 49 Helgadottir A, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Holm H, Patel RS, Gudnason T, et al. Apolipoprotein(a) genetic sequence variants associated with systemic atherosclerosis and coronary atherosclerotic burden but not with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(8):722–9.
- 50 Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM, et al.; CHARGE Extracoronary Calcium Working Group. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2013;368(6):503–12.
- 51 AIM-HIGH Investigators, Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, Chaitman BR, Desvignes-Nickens P, Koprowicz K, McBride R, Teo K, Weintraub W. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med*. 2011;365(24):2255–67.
- 52 HPS2-THRIVE Collaborative Group, Landray MJ, Haynes R, Hopewell JC, Parish S, Aung T, Tomson J, Wallendszus K, et al. Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients. *N Engl J Med*. 2014;371(3):203–12.
- 53 Cannon CP, Shah S, Dansky HM, Davidson M, Brinton EA, Gotto AM, et al.; Determining the Efficacy and Tolerability Investigators Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2010;363(25):2406–15.
- 54 Nicholls SJ, Brewer HB, Kastelein JJ, Krueger KA, Wang MD, Shao M, et al. Effects of the CETP inhibitor evacetrapib administered as monotherapy or in combination with statins on HDL and LDL cholesterol: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2011;306(19):2099–109.
- 55 Stein EA, Honarpour N, Wasserman SM, Xu F, Scott R, Raal FJ. Effect of the proprotein convertase subtilisin/kexin 9 monoclonal antibody, AMG 145, in homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 2013;128(19):2113–20.
- 56 Raal FJ, Giugliano RP, Sabatine MS, Koren MJ, Langslet G, Bays H, et al. Reduction in lipoprotein(a) with PCSK9 monoclonal antibody evolocumab (AMG 145): a pooled analysis of more than 1,300 patients in 4 phase II trials. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(13):1278–88.
- 57 Deshmukh HA, Colhoun HM, Johnson T, McKeigue PM, Betteridge DJ, Durrington PN, et al.; CARDS, ASCOT, and PROSPER Investigators. Genome-wide association study of genetic determinants of LDL-c response to atorvastatin therapy: importance of Lp(a). *J Lipid Res*. 2012;53(5):1000–11.
- 58 Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Borén J, Andreotti F, Watts GF, et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2010;31(23):2844–53. Epub 2010 Oct 21.
- 59 Robinson JG. What is the role of advanced lipoprotein analysis in practice? *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(25):2607–15.
- 60 Lp-PLA(2) Studies Collaboration, Thompson A, Gao P, Orfei L, Watson S, DiAngelantonio E, Kaptoge S, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of

- coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet*. 2010;375(9725):1536–44.
- 61 Cook NR, Paynter NP, Manson JE, Martin LW, Robinson JG, Wassertheil-Smoller S, et al. Clinical utility of lipoprotein-associated phospholipase A₂ for cardiovascular disease prediction in a multiethnic cohort of women. *Clin Chem*. 2012;58(9):1352–63.
- 62 Ridker PM, MacFadyen JG, Wolfert RL, Koenig W. Relationship of lipoprotein-associated phospholipase A₂ mass and activity with incident vascular events among primary prevention patients allocated to placebo or to statin therapy: an analysis from the JUPITER trial. *Clin Chem*. 2012;58(5):877–86.
- 63 Ryu SK, Mallat Z, Benessiano J, Tedgui A, Olsson AG, Bao W, et al.; Myocardial Ischemia Reduction With Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Trial Investigators. Phospholipase A₂ enzymes, high-dose atorvastatin, and prediction of ischemic events after acute coronary syndromes. *Circulation*. 2012;125(6):757–66.
- 64 STABILITY Investigators. Darapladib for preventing ischemic events in stable coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2014;370(18):1702–11.
- 65 O'Donoghue ML, Braunwald E, White HD, Steen DP, Lukas MA, Tarka E, et al.; SOLID-TIMI 52 Investigators. Effect of darapladib on major coronary events after an acute coronary syndrome: the SOLID-TIMI 52 randomized clinical trial. *JAMA*. 2014;312(10):1006–15.