

## Artikelen

### Extra zwaar LDL en apo B als alternatief voor de lipidenstatus van patiënten met een verhoogd risico op hart- en vaatziekten

P.N.M. DEMACKER, M. VEERKAMP, J. de GRAAF, S.J.H. BREDIE, D.W. SWINKELS<sup>1</sup> en A.F.H. STALENHOEF

Een afwijkend lipoproteïnenpatroon kan een risico zijn voor hart- en vaatziekten. Doorgaans worden plasma cholesterol en triglyceriden bepaald om een afwijkend lipoproteïnenpatroon vast te stellen. Indien er afwijkingen zijn, wordt er verder gedifferentieerd door middel van lipoproteïnenanalyse. Door Sniderman en Cianflone (12) is gesteld dat al deze analyses simpel vervangen zouden kunnen worden door een enkelvoudige apolipoproteïne B bepaling. Bijkomend voordeel is dat de patiënt niet nuchter hoeft te zijn. Op basis van één enkele parameter zou het makkelijker zijn tot een beslissing te komen dan op basis van een gewogen meting met meer parameters.

We vergeleken beide benaderingen in een familiestudie waarin 506 personen participeerden. Ondanks het feit dat we geen coronaire arteriografie data hadden als gouden standaard, bleek het informatief om de groepen te vergelijken die met beide benaderingen waren ingesloten in de normaal- of in de hoge risicogroep. Op deze manier identificeerden wij o.a. een groep met het klassieke normolipidemische hyperapobetalipoproteïnemie. Vastgesteld kon worden dat al deze patiënten een plasma triglyceridenconcentratie hadden van 1,5 tot 2,0 mmol/l. Dit suggereert dat bij een plasma triglyceridenwaarde vanaf 1,5 mmol/l er sprake is van eiwitrijk- en dus extra zwaar LDL. Door de cumulatieve percentages van de triglyceridenfrequentieverdeling te vergelijken kon worden vastgesteld dat een triglyceridenwaarde van 1,5 mmol/l een bijna perfecte grens is tussen enerzijds licht en zwaar LDL en anderzijds extra zwaar LDL ( $k < -0.25$ ).

Deze resultaten vormen een pleidooi om de bovenste limiet voor de plasma triglyceridenconcentratie meer facultatief te stellen; een waarde rond 1,5 mmol/l is in ons materiaal realistischer. Verder bevestigen de resultaten de hoge diagnostische betekenis van de totaal apo B bepaling.

*Trefwoorden: hyperlipidemie; apolipoproteïne B; hart- en vaatziekten; risicoschatting*

*Afdeling Interne Geneeskunde en het Centraal Klinisch Chemisch laboratorium<sup>1</sup>, Academisch Ziekenhuis Nijmegen*

Correspondentie: Dr. P.N.M. Demacker, 564 CKCL, Academisch Ziekenhuis Nijmegen, 6500 HB Nijmegen.  
E-mail: P.Demacker@AIG.AZN.NL

De ontwikkeling van nieuwe bepalingen in de klinische chemie wordt gekenmerkt door twee bewegingen. Allereerst de wisselwerking tussen kliniek en laboratorium: nieuwe methodes zijn nodig voor het ophelderen van een klinische vraagstelling en een nieuwe vraagstelling vraagt weer om nieuwe methodes om verder te komen. Wanneer het belang van een bepaalde parameter voor het vaststellen van een ziekte eenmaal bekend is, dan nog zal deze bepaling steeds weer moeten worden aangepast op basis van de nieuwste mogelijkheden van het analytisch instrumentarium. Dit is de tweede beweging die steeds weer opgeld doet in de klinische chemie. Onderdeel van deze beweging is ook het evalueren van de diagnostische "power" van een bepaalde parameter ten opzichte van vergelijkbare parameters. Deze laatste vraag wordt steeds weer opgeworpen door recente bevindingen in de literatuur.

Sinds de jaren vijftig wordt op de klinisch-chemische laboratoria cholesterol in het plasma bepaald voor inzicht in de lipidenstatus. Na de ontwikkeling van enzymatische methodes was het mogelijk om plasma triglyceriden te bepalen. Toen meer bekend werd over het lipoproteïnen transport systeem volgden: het lipidogram (kwalitatieve bepaling van alle lipoproteïnen na elektroforese), de HDL-chol bepaling, de lipoproteïnen-analyse (kwantitatieve bepaling van de drie voornaamste lipoproteïnenklassen mbv een gecombineerde ultracentrifugatie- en precipitatie-methode), methodes voor het bepalen van apoproteïnen (apo A-1 en apo B) en de LDL- en HDL subfracties. Alle bepalingen zijn zeker belangrijk voor het onderzoek, maar welke bepalingen geven nu het beste inzicht in de lipidenstatus en in het daarmee samenhangende risico voor atherosclerose? Ontegenzeggelijk is de totale cholesterolbepaling nog steeds de belangrijkste indicator voor de risicoschatting voor atherosclerose en coronaire hartziekten. Andere parameters dragen daar meer of minder toe bij. Deze bijdrage gaat over de waarde van een aantal recent geïntroduceerde parameters: zwaar (cholesterol-arm en eiwitrijk) LDL en totaal plasma apo B met betrekking tot de lipidenstatus van een patiënt.

#### MATERIAAL en METHODEN

Het onderzoek is gebaseerd op plasma monsters die beschikbaar kwamen bij familieonderzoek naar de

oorzaak en genetische overerving van familiale gecombineerde hyperlipidemie (FCH). Dit is de meest voorkomende erfelijke lipidenstofwisselingsstoornis met een prevalentie van 5% (1,2). De keuze viel op deze monsters, omdat in deze families plasma cholesterol en of triglyceriden concentraties, plasma apo B, HDL-chol en het LDL-subfractiepatroon sterk variëren (3).

Uitgaande van propositi met een verhoogd plasma cholesterol of triglyceridengehalte werden familieleden in de eerste en tweede graad benaderd voor het doneren van bloed ter bepaling van een aantal lipiden en lipoproteïnen parameters in het plasma. In totaal werden 506 mensen ingesloten stammende uit 32 families. De personen waren, afgezien van de lipidenstofwisselingsstoornis, allemaal goed gezond, voor zover kon worden nagegaan door lichamelijk onderzoek (anamnese) aangevuld met enkele klinisch-chemische testen. Personen met diabetes, lever- en endocriene ziekten werden uitgesloten van deelname. Ook personen met een duidelijk overgewicht (BMI > 30 mg/kg) werden uitgesloten. Het onderzoek was goedgekeurd door de Ethische Commissie van het Academisch Ziekenhuis Nijmegen.

### Bloedverzameling

Het bloed werd verzameld op de polikliniek, een wijkcentrum of bij een familielid thuis. De personen hadden gevast vanaf 20.00 uur de dag tevoren. Op deze dag was een normaal maaltijdenpatroon aangehouden en de samenstelling van de maaltijden was eveneens normaal. Iedereen werd gevraagd op de dag voorafgaande aan de bloedprik zijn/haar normale lichamelijke activiteitenpatroon te handhaven. Patiënten met bekende hoge lipidenwaarden die met hypolipidemische medicamenten werden behandeld stopten met deze middelen minimaal 4 weken voor de meting. Het bloed werd afgenomen in vacutainer buizen die EDTA bevatten. Het plasma werd geïsoleerd binnen 3 uur na afname. De meeste analyses werden dezelfde dag nog bepaald. LDL-subfracties en apoproteïne B werden bepaald in ingevroren (-80°C) plasma dat was voorzien van 600 mg/l saccharose als cryoprotectant.

### Analytische methodes

Plasma cholesterol en triglyceriden werden gemeten op een centrifugale analyser (Multistat III, Instrumentation Laboratory, Lexington, Massachusetts) met enzymatische methodes (Chod-PAP, Boehringer-Mannheim, Duitsland, cat no 23774) en Sera Pak, Miles, Tournay, België (cat no 6669), HDL-cholesterol werd bepaald met de PEG-6000 methode (4). LDL-cholesterol werd berekend met de Friedewald formule (5). De uitslagen verkregen met behulp van deze formule kwamen goed overeen met die waarden welke werden verkregen met ultracentrifugatie, waarmee wederom werd bevestigd dat de LDL-chol waarde verkregen met de Friedewald berekening betrouwbaar is en een goed inzicht geeft in de hoeveelheid atherogene lipoproteïnen (6). Voor de diagnostiek werden de volgende limieten gehanteerd: de bovenste grens van de referentiewaarden. Voor totaal plasma cholesterol: 6,5

mmol/l; voor plasma triglyceriden: 2,0 mmol/l; voor LDL-chol: 4,5 mmol/l en voor plasma apoproteïne B: 1250 mg/l, HDL-cholesterol werd als normaal beschouwd als de waarde lag tussen 0,9 en 1,45 mmol/l. De plasma apo B bepaling werd uitgevoerd met een in huis ontwikkelde methodiek op basis van een eerder door Lopes-Virella e.a. beschreven variant (7). Het gebruikte antiserum was polyclonaal, ontwikkeld bij een konijn met humaan LDL als antigeen. Dit LDL bevat alleen apo B-100 als proteïne. Het anti apo B antiserum was specifiek: het reageerde niet met albumine of andere apoproteïnen. Om storing door konijnen apo B en IgG's te voorkomen werd het antiserum voor gebruik behandeld met 7,5% (w/v) PEG-4000 1:2 (v/v). Na incubatie werd het antiserum gecentrifugeerd en gefilterd door een 0,2 µm filter. Het monster (30 µl) werd 20 of 100 keer verdund met saline, vervolgens geïncubeerd met 40 µl antilichaam-oplossing gedurende 20 min gevolgd door nefelometrische analyse. Als secundaire standaard werd een serum pool gebruikt, opgeslagen bij -80°C. Als primaire standaard werd LDL (het antigeen) gebruikt, het eiwitgehalte werd bepaald met een gemodificeerde Lowry methode. Voor optimale juistheid werd een 14-tal monsters met een grote variatie in apo B concentraties ook geanalyseerd door Dr Marcovina in Seattle met een op een klassieke RIA geijkte immunonephelometrische methode met gebruikmaking van het officiële standaardserum ontwikkeld door de Internationale Commissie van Immunologische Verenigingen (IUIS) onder auspiciën van het WHO-IFCC (8). Hoewel er een goede correlatie werd gevonden ( $r=0,998$ ), bleek er een systematisch verschil te zijn tussen de uitslagen gescoord door beide laboratoria. Deze afwijkingen zijn vermoedelijk te wijten aan een probleem met de primaire standaard en/of met de eiwit meetmethode (methode van Lowry et al met  $\text{CHCl}_3$  extractie van de te meten oplossingen) ter vaststelling van de concentratie in die standaard. Om te voldoen aan de internationaal vastgestelde criteria voor juistheid van de apo B bepaling moesten de scores uit Nijmegen worden omgerekend met behulp van de volgende formule:  $y = 0,73x + 49$  ( $x$  = Nijmegen). Na correctie was de gemiddelde en absolute afwijking bij de apo B meting: 0,5%, respectievelijk 2,7%. De afwijkingen waren onafhankelijk van de plasma triglyceriden concentraties van de monsters tot een waarde van 8 mmol/l.

### Meting van het LDL-subfractiepatroon

Het LDL-subfractiepatroon werd geregistreerd na dichtheidsgradiënt-ultracentrifugatie van het plasma (9,10). Alvorens te ultracentrifugeren werd Coomassie Brilliant Blue toegevoegd, dit kleurt de serum eiwitten en apoproteïnen blauw. Het plasma werd verzaard door oplossing van 0,42 g KBr/3 ml; hierdoor werd een dichtheid verkregen van  $d = 1,10$  g/ml. Vervolgens werden hier bovenop met behulp van een buret achtereenvolgens de volgende lagen toegevoegd: 2 ml  $d = 1,065$  g/ml; 3 ml  $d = 1,035$  g/ml; 3 ml  $d = 1,20$  g/ml en 1,5 ml  $d = 1,006$  g/ml. Voor optimale kleuring waren de dichtheidsoplossingen aangezuurd met 1 M HCl tot een pH van 4,5-5. Na ultracentrifugatie bij

37.000 rpm (160,000g) en 20°C gedurende 19,5 uur in een Beckman L7-55 ultracentrifuge (Beckman Instruments, Palo Alto, CA), waren tot 5 banden in het LDL dichtheidsgebied zichtbaar die als volgt werden benoemd: LDL-1:  $d=1,030-1,033$  g/ml; LDL-2:  $d=1,033-1,054$  g/ml; LDL-3:  $d=1,040-1,045$  g/ml; LDL-4:  $d=1,045-1,049$  g/ml en LDL-5:  $d=1,049-1,054$  g/ml. De fracties werden geaspireerd door middel van een Pasteur pipet. Op basis van de cholesterol concentratie van elke fractie werd de variabele K berekend ( $-1 < K < 1$ ) als maat voor de gemiddelde dichtheid van het geheel der LDL-deeltjes. De formule was zodanig samengesteld, dat een K waarde  $< -0,25$  een extra zwaar LDL subfractiepatroon weergeeft, een positieve waarde  $K > 0$  een licht subfractiepatroon karakteriseert, terwijl een K waarde  $-0,25 < K < 0$  een zwaar LDL weergeeft (9). De hier gebruikte afkappwaarde voor K ( $K = -0,25$ ) is strenger dan de eerder door ons gehanteerde afkappwaarde welke bij nul lag. Dit betekent dat wij op basis van de definitie voor K niet “zwaar” maar “extra zwaar” LDL op het oog hebben (9).

## RESULTATEN

### Plasma lipiden, lipoproteïnen en apoproteïne B concentraties in personen met verschillende LDL-dichtheidsprofielen

In de nu volgende studie werden de karakteristieken van de personen met een K-waarde vallend binnen de gedefinieerde grenzen vergeleken. Van de groep met licht LDL (groep 1) tot de groep met extra zwaar LDL (groep 3) is er een toename van concentraties voor alle parameters (tabel 1). Met name in de triglyceriden is er een groot verschil in de gemiddelde concentraties tussen de drie groepen. De drie groepen verschillen ook sterk in de gemiddelde HDL-chol concentraties, zij het dat deze afnemen van groep 1 naar 3. Op grond van de lipiden- en lipoproteïnen-status heeft groep drie dus gemiddeld het grootste risico voor hart- en vaatziekten.

**Tabel 1.** Plasma lipiden, lipoproteïnen en apoproteïne B bij nuchtere personen ingedeeld op basis van het LDL-subfractiepatroon

Parameter	Licht LDL variabele <sup>a</sup> K>0	Zwaar LDL 0<K<-0,25	Extra zwaar LDL K<-0,25
N	133	151	224
Leeftijd (jr)	36,5 ± 16,3	37,7 ± 16,6	46,4 ± 15,9 <sup>c</sup>
Plasma cholesterol	5,23 ± 1,13	5,48 ± 1,35	6,40 ± 1,30 <sup>c</sup>
Plasma triglyceriden	0,88 ± 0,51	1,42 ± 1,42 <sup>b</sup>	2,69 ± 1,84 <sup>c</sup>
HDL-chol	1,45 ± 0,33	1,24 ± 0,33 <sup>b</sup>	0,99 ± 0,25 <sup>c</sup>
LDL-chol	3,40 ± 1,04	3,68 ± 1,26 <sup>b</sup>	4,27 ± 1,09 <sup>c</sup>
Plasma apo B	1050 ± 272	1218 ± 338 <sup>b</sup>	1616 ± 378 <sup>c</sup>
LDL-chol/plasma apo B	3,31 ± 0,40	3,06 ± 0,50 <sup>b</sup>	2,65 ± 0,57 <sup>c</sup>

Plasma concentraties van de lipiden en lipoproteïnen in mmol/l en apo B in mg/l; <sup>a</sup>: dichtheidsvariabele K is gedefinieerd in Materialen en Methodes; <sup>b</sup>:  $p < 0,005$  extra zwaar LDL versus beide andere groepen (ANOVA). <sup>c</sup>:  $p < 0,05$  extra zwaar LDL versus intermediair LDL (ANOVA)

Alle variabelen van groep 1 en 3 blijken significant te verschillen. Ook wanneer groep 2 met 3 wordt vergeleken, blijken de meeste parameters te verschillen. De ratio LDL-chol/totaal apo B welke een benadering is voor de dichtheid van het LDL blijkt het hoogste te zijn in groep 1 ( $3,31 \pm 0,40$ ); intermediair in groep 2 ( $3,06 \pm 0,50$ ) en het laagst in de groep met zwaar LDL ( $2,65 \pm 0,57$ ). Dit bevestigt dat LDL-1 de laagste dichtheid heeft.

### De overlap in de selectie van patiënten bij het hanteren van de twee diagnostische criteria: lipidenstatus versus apoproteïne B bepaling

Wanneer een oude methode wordt vervangen door een nieuwe o.a. om financiële redenen of omwille van een betere efficiëntie, dan is het belangrijk dat de nieuwe methode meer patiënten selecteert die vatbaar zijn voor of al lijden aan een bepaalde ziekte dan de oude methode. Het ondubbelzinnig vaststellen van atherosclerose vraagt echter om invasieve diagnostiek, zoals coronair arteriografie. Om economische en ethische redenen is deze diagnostiek terecht beperkt tot een heel selecte groep met ernstige coronaire klachten. Het merendeel van de door ons ingesloten personen komt niet in aanmerking voor arteriografie. Hoewel wij dus geen ijkpunt hebben voor wat betreft atherosclerose en het dus moeilijk is sensitiviteit en specificiteit van de onderzochte parameters te vergelijken, is het wel mogelijk om te kijken welke en hoeveel patiënten we met de ene parameter of met de andere parameter insluiten. We pasten dus de volgende benadering toe: allereerst stelden we vast welke apo B grenswaarde het beste past bij de gehanteerde bovenlimieten voor normaal cholesterol, triglyceriden, LDL-chol en HDL-chol. Dit werd vergemakkelijkt door de cholesterolwaarden van alle patiënten in een reeks te zetten die toenam van laag tot hoog. De bijbehorende LDL-chol, plasma triglyceriden en apo B waarden werden ook vermeld. Op deze manier werd snel duidelijk dat in de overgang van normaal naar verhoogd cholesterol en/of triglyceriden en/of LDL-chol en/of HDL-chol, een grenswaarde van apo B = 1250 mg/l het beste past. Dit is overigens dicht in de buurt van de waarde 1200 mg/l die door Contois et al (11) als grenswaarde is voorgesteld op basis van een epidemiologisch onderzoek. Vervolgens begon dus het indelen: patiënten met één of meer afwijkende lipiden/lipoproteïnen concentraties versus een afwijkende apo B concentratie.

Binnen de groep met een apo B concentratie  $< 1250$  mg/l ( $n = 223$ ) was er een subgroep (groep A, 18,8%) met lage HDL-chol waarden (tabel 2). Echter, totaal plasma cholesterol was eveneens laag normaal. Dit roept de vraag op of hier sprake is van een verhoogd risico. Wanneer men de traditionele lipiden-benadering hanteert, met eerst de bepaling van cholesterol en triglyceriden en bij een eventuele afwijking pas verder differentieert door dan ook de lipoproteïnenconcentraties in de overweging te betrekken, dan heeft deze groep een normaal risico.

Afgezien van deze subgroep A, was er een verrassend grote overlap tussen beide diagnostische criteria in de groep met een apo B concentratie  $< 1250$  mg/l. Met

**Tabel 2.** Selectie van patiënten volgens twee diagnostische criteria met gebruikmaking van data van 506 personen uit een familie-screening naar de aandoening Familiair Gecombineerde Hyperlipidemie (FCH)

	Normale lipiden				Abnormale lipiden**
	HDL-chol laag*	TG<1.5	1.5<TG<2	HDL-chol>	
Apo B<1250 (n=223)	42 (18,8%)	172	9	NR	0
Apo B>1250 (n=283)	0	0	31 (10,9%)	6	246

NR: niet relevant; \*: cholesterol ook laag; \*\*:deze personen hebben een of meer van de volgende parameters verhoogd: plasma cholesterol, plasma triglyceriden, VLDL-cholesterol, VLDL-triglyceriden, LDL-cholesterol

exclusie van groep A werden er in 81,2% van de gevallen dezelfde patiënten ingesloten; met inclusie van groep A was er zelfs bijna complete overeenkomst (>99%).

De groep met een apo B concentratie >1250 mg/l (n=283) omvatte 6 personen (allen vrouwen) met een verhoogde HDL-chol concentratie. Verder werden er 31 personen gevonden (10,9%) met "normale" lipiden of lipoproteïnenconcentraties. Hierbij moet worden opgemerkt, dat bij al deze personen de plasma triglyceridenconcentratie minimaal 1,5 mmol/l was. Bij hantering van een grenswaarde voor triglyceriden van 2,0 mmol/l, verschilt de indeling van deze personen wat betreft het risico voor atherosclerose; verlaging van de afkapgrens voor plasma triglyceriden tot 1,5 mmol/l leidt wel tot identieke insluiting van deze 31 personen: ze behoren dan tot de hoge risicogroep. Er werd verdere steun gevonden voor het argument de bovenste limiet voor de plasma triglyceridenconcentratie te verlagen: in de gehele groep van 506 personen waren er 76 met een plasma triglyceridenwaarde tussen 1,5 mmol/l en 2,0 mmol/l. Slechts 9

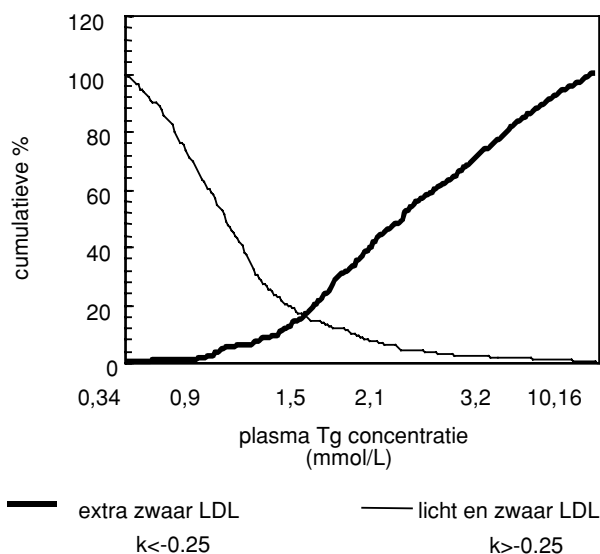
hiervan hadden een normale apo B concentratie. Dit benadrukt dat een stijging van de plasma triglyceriden van 1,5 tot 2,0 mmol/l gepaard gaat met een buiten-proportionele stijging van apo B concentratie. De vraag dringt zich dan ook op: zouden patiënten met een triglyceridenwaarde boven 1,5 mmol/l een afwijkend LDL-subfractie patroon hebben?

### De relatie tussen extra zwaar LDL met apo B en plasma triglyceriden verder uitgediept

Het bovenstaande suggereert het bestaan van subgroepen waarbij een triglyceriden concentratie van 1,5 mmol/l mogelijk een belangrijk beslistpunt is en dat dit mogelijk gerelateerd is aan het soort LDL subfractiepatroon. Om hier meer inzicht in te krijgen hebben we de verdeling van de plasma triglyceriden bekeken voor de groepen met extra zwaar LDL ( $K < -0.25$ ) ten opzichte van een groep met een licht + intermediair LDL-subfractiepatroon. Bij een bepaalde manier van presentatie (spiegeling van een curve om de horizontale as, dwz de curve 180° gedraaid) wordt snel duidelijk dat een plasma triglyceridenwaarde van 1,5 mmol/l een goed onderscheid maakt tussen beide groepen; er is maar weinig overlap bij deze TG waarde (figuur 1).

## DISCUSSIE

In deze studie, met gebruikmaking van data uit een unieke verzameling van familieleden van patiënten met familiair gecombineerde hyperlipidemie, konden wij aantonen dat er een grote overlap bestaat tussen 2 verschillende benaderingen om personen te identificeren met een verhoogd risico op hart- en vaatziekten. Zijn er voor de klassieke diagnose (lipiden- en lipoproteïnen) een viertal parameters nodig om de diagnose te stellen, voor de moderne diagnose (op basis van apolipoproteïne B) is slechts één parameter nodig (12). Op grond van deze bevindingen is er dus veel te zeggen om over te stappen op de bepaling van apolipoproteïne B alleen. Dit is te meer aantrekkelijk omdat voor deze bepaling de patiënt niet nuchter hoeft te zijn. Vooral omdat in de klassieke benadering LDL-chol wordt berekend via de Friedewald formule is het voor deze benadering nodig dat de patiënt overnacht heeft gevast en dus nuchter is geprikt en een plasma triglyceridenwaarde heeft van <8 mmol/l. Overigens wil dit niet betekenen dat men de moderne variant de gehele dag kan toepassen, onafhankelijk van de voedingstoestand (nuchter/niet nuchter) van



**Figuur 1.** Cumulatieve frequentie verdeling van de plasma triglyceriden over de groepen met licht en zwaar LDL versus extra zwaar LDL. Opmerking: de frequentie verdeling voor triglyceriden in de groep van licht en zwaar LDL is gecombineerd en de curve is tevens ten opzichte van de horizontale as 180° gedraaid ten einde het vaststellen van een grenswaarde met de groep die extra zwaar LDL heeft te vergemakkelijken.

de patiënt. In de loop van de middag en avond neemt de postprandiale lipemie bij een normaal maaltijdenpatroon toe en dit kan gepaard gaan met een voorbijgaande stijging van de apo B concentratie.

Wanneer we beide diagnostische criteria toepassen op de gehele groep, blijken er verschillende subgroepen te zijn die met het ene criterium een normale risicoschatting hebben en met het andere criterium een verhoogde risicoschatting, of omgekeerd. Ook zijn er kleine subgroepjes waarbij de risicoschatting met lipiden/lipoproteïnen op basis van maar één afwijkende parameter niet goed is te maken. Wordt er nog een tweede parameter bij betrokken, dan is er veel meer overeenstemming voor het insluiten van personen in de hoge risicogroep. De grootste groep die vragen oproept voor wat betreft het al of niet hebben van een vergroot risico voor hart- en vaatziekten heeft normale lipiden en lipoproteïnen, maar een apo B waarde boven de grenswaarde van 1250 mg/l. Op basis van de literatuur kan deze groep worden geïdentificeerd als personen met het klassieke beeld van normolipemische hyperapobetalipoproteïnemie (13). Zij hebben een verhoogd risico op hart- en vaatziekten. We konden duidelijk aantonen dat het een overgangsgroep betreft: al dezen hadden een plasma triglyceriden tussen 1,5 en 2,0 mmol/l. Dit suggereert dat de boven limiet voor normaal triglyceriden bij 1,5 mmol/l zou moeten liggen. Dit wordt ondersteund door de bevinding dat een plasma triglyceridengehalte van 1,5 mmol/l cruciaal is om personen met een licht en intermediair LDL te onderscheiden van personen met een extra zwaar en atherogeen LDL. Er is duidelijk een marge in de meting: patiënten met een plasma triglyceridenconcentratie tussen 1,5 en 2,0 mmol/l en met een apo B concentratie rond 1250 mg/l vormen duidelijk een overgangsgroep tussen normaal en abnormaal. Dit ondersteunt de huidige trend om een gewogen risicoschatting te hanteren, zoals ook geldt voor cholesterol (NCEP criteria) (14). Afgezien van de vraag waar de grens voor normaal en abnormaal nu precies ligt, is het zaak om de meetmarge zo klein mogelijk te houden. Gezien het feit dat de biologische variatie in de plasma triglyceridenconcentratie nogal groot is (15), is zo'n scherpe limiet bij een eenmalige waarneming verbazingwekkend. Kennelijk is de biologische variatie in de plasma triglyceriden bij de bestudeerde groep lager dan meestal wordt waargenomen. Dit kan samenhangen met het sterk gestandaardiseerde prikprogramma in het kader van familie-screening. De vraag is of er een verschil is ten opzichte van een incidentele en individuele screening op de polikliniek? Is men bij familie-screening beter nuchter, beter geconditioneerd, minder gehaast? De biologische variatie van apo B wordt voornamelijk bepaald door de halfwaardetijd van LDL en bedraagt enkele dagen (16). Dit is aanzienlijk langer dan de halfwaarde tijd voor VLDL (enkele uren) welke voornamelijk de variatie in triglyceriden bepaalt. Ter vermindering van de invloed van de biologische variatie verdient apolipoproteïne B als diagnostisch criterium extra voorkeur. Vooral in het overgangsgebied tussen normaal en abnormaal is een eenmalige meting van apo B veel minder gevoe-

lig voor de diurnale variatie dan een meting van plasma triglyceriden. Hier dringt zich de vergelijking op met de parameters die de glucose homeostase bij de mens het beste weergeven. De plasma apo B concentratie reflecteert het lipoproteïnenmetabolisme over enkele dagen, net als de Hb A1c concentratie een gemiddelde maat is voor de plasma glucose concentratie over een lang tijdsbestek. Uit het bovenstaande moet duidelijk zijn dat het criterium apo B geen onafhankelijke risicofactor voor atherosclerose is: de concentratie hiervan is duidelijk gerelateerd aan de concentraties van lipiden en lipoproteïnen. Dit is een bevinding die overigens 10 jaar geleden ook al eens is vastgesteld, in een geheel andere verzameling van patiënten (17). Speciaal voor epidemiologisch onderzoek is het handig als men kan volstaan met slechts één parameter, dit is zeker het geval als de onderzochte persoon niet persé nuchter hoeft te zijn. Echter, afwijkende waarden voor plasma triglyceriden en HDL-chol komen het meeste voor op hogere leeftijd (>40 jaar), dan gaan insuline resistentie en zich ontwikkelende diabetes een woordje meespreken. Om ook hier inzicht in te krijgen dient men ook nuchter glucose te bepalen. Hiermee vervalt dan een van de argumenten die pleiten voor een breed gebruik van apo B als parameter voor de risicoschatting voor hart- en vaatziekten. Verder geeft apo B wel inzicht in een risico voor atherosclerose, maar in principe geeft het geen inzicht in de lipidenstatus. Dus voor het instellen van een therapie zal men in tweede instantie toch de lipidenstatus moeten weten.

#### Dankbetuiging

De auteurs danken Heidi Hak Lemmers, Janine Vogelaar en Helga Toenhake Dijkstra voor de analytische assistentie, en Prof. Dr Santica Macovina en Mr Hal Kennedy (University of Washington, Seattle) voor de hulp bij de standaardisering van de apo B bepaling respectievelijk de hulp bij de statistische verwerking.

#### Literatuur

1. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulski AG. Hyperlipidemia and coronary heart disease. II Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973; 52:1544-1568.
2. Grundy SM, Chait A, Brunzell JD. Familial combined hyperlipidemia workshop. *Arteriosclerosis* 1987; 7(2): 203-207.
3. Bredie SJH. Familial combined hyperlipidemia. Metabolic and genetic aspects. Thesis, University of Nijmegen, 1997.
4. Demacker PNM, Hijmans AGM, Vos-Janssen HE, van 't Laar A, Jansen AP. A study of the use of polyethylene glycol in estimating cholesterol in high density lipoprotein. *Clin Chem* 1980; 26:1775-1777.
5. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 38: 150-160.
6. Demacker PNM, Toenhaake-Dijkstra H, de Rijke YB, Stalenhoef AFH, Willems JL. On the presumed inaccuracy of the Friedewald formula in hyperlipidemic plasma. A role for imprecise analysis? *Clin Chem* 1996; 42: 1492-1494.
7. Lopes-Virella MF, Virella G, Evans G, Malenkos SB, Colwell JA. Immunonephelometric assay of the apolipoprotein A-I. *Clin Chem* 1980; 26: 1205-1208.

8. Marcovina SM, Albers JJ. Standardization of the immunological determination of apolipoproteins A-1 and B: A report on the International Federation of Clinical Chemistry Meeting on standardization of apolipoprotein A-1 and B measurements (basis for future consensus), Vienna, Austria, April 18-19, 1989.
9. Swinkels DW, Hak-Lemmers HLM, Demacker. Single spin density gradient ultracentrifugation method for the detection and isolation of light and heavy low density lipoprotein subfractions. *J Lipid Res* 1987; 28: 1233-1239.
10. De Graaf J, Swinkels DW, de Haan AFJ, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Both inherited susceptibility and environmental exposure determine the low density lipoprotein subfraction pattern distribution in healthy Dutch families. *Am J Human Genet* 1992; 51: 1295-1310.
11. Contois JH, McNamara JR, Lammi-Keefe CJ, Wilson PWF, Massov T, Schaeffer EJ. Reference intervals for plasma apolipoprotein B determined with a standardized commercial immunoturbidimetric assay: results from the Framingham Offspring Study. *Clin Chem* 1996; 42: 515-523.
12. Sniderman AD and Cianflone K. Measurement of apoproteins: Time to improve the diagnosis and treatment of the atherogenic dyslipoproteinemia. Editorial. *Clin Chem* 1996; 42: 489-491.
13. Sniderman A, Shapiro S, Marpole D, Skinner B, Teng B, Kwitovitch PO. Association of coronary atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia (increased protein but normal cholesterol levels in human plasma low density lipoproteins). *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 604-608.
14. Bachorik PS, Ross JW. National Cholesterol Education, recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol; executive summary. *Clin Chem* 1995; 41: 1414-1420.
15. Demacker PNM, Schade RB, Jansen RTP, van 't Laar A. Intra-individual variation of serum cholesterol, triglycerides, and high density lipoprotein cholesterol in normal humans. *Atherosclerosis* 1982; 45: 259-266.
16. Kissebah AH, Alfarski S, Adams PW. Integrated regulation of very low density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein-B kinetics in man. Normolipidemic subjects, familial hypertriglyceridemia and familial combined hyperlipidemia. *Metabolism* 1981; 30: 856-868.
17. Swinkels DW, Demacker PNM, Hendriks JCM, Breninkmeijer BJ, Stuyt PMJ. The relevance of a protein-enriched low density lipoprotein as a risk for coronary heart disease in relation to other known risk factors. *Atherosclerosis* 1989; 77: 59-67.

### Summary

*Very dense LDL and an elevated plasma apolipoprotein B concentration as alternatives for the lipid status of patients with an increased risk for atherosclerosis. Demacker PNM, Veerkamp M, Graaf J de, Bredie SJH, Swinkels DW and Stalenhoef AFH. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 44-49.*

A deviating lipoprotein pattern can be a risk factor for atherosclerosis and coronary heart disease. Usually, plasma cholesterol and triglyceride concentrations are determined to get an insight into a possible lipoprotein abnormality. If there are deviations, lipoprotein analysis will allow a further differentiation. Sniderman and Cianflone (12) recently proposed that this multiple parameter approach can be replaced by a single apolipoprotein B analysis with the advantage that the examined person does not need to be examined in fasting state.

We compared both approaches in a family study in which 506 persons participated. Despite the fact that we missed the golden standard coronary arteriography, it was informative to compare the groups that were included with either parameter in the normal or high risk group. By this means we identified persons with the classical pattern called normolipidemic hyperapobetalipoproteinemia. It was found that all these patients had a plasma triglyceride concentration between 1.5 and 2.0 mmol/l which suggests that from a plasma triglyceride value of 1.5 mmol/l or higher the LDL subfraction pattern becomes very dense. By comparing the cumulative percentages of the distribution of triglycerides, it could be shown that a plasma triglyceride value of 1.5 mmol/l perfectly distinguished between the groups with light and dense LDL versus extra dense LDL.

These results are a plea to decrease the upper limit for the plasma triglycerides to 1.5 mmol/l. In addition, the results confirm the high diagnostic potential of the plasma apolipoprotein B concentration.

*Keywords: hyperlipidemia; apolipoprotein B; coronary heart disease; risk estimation*

*Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 49-52*

## Moleculaire liquordiagnostiek van leptomeningeale metastasen

D.W. SWINKELS<sup>1</sup>, J.B. de KOK<sup>1</sup>, O.J.M. VOGELS<sup>2</sup>, A. HANSELAAR<sup>3</sup>, K. J.B. LAMERS<sup>4</sup>, J. GIJTENBEEK<sup>2</sup>  
en R.H. BOERMAN<sup>2,5</sup>

**Moleculaire detectie van van de tumor afkomstig DNA in de liquor cerebrospinalis biedt mogelijkheden voor vroege en gevoelige detectie van leptomeningeale metastasen (LMM). We beschrijven de detectie van**

*Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>, Neurologie<sup>2</sup>, Pathologie<sup>3</sup> en Laboratorium Kindergeneeskunde en Neurologie<sup>4</sup>, Academisch Ziekenhuis Nijmegen St. Radboud; Neurologie, Ziekenhuis Rijnstate Arnhem<sup>5</sup>.*

Correspondentie: Dr. D.W. Swinkels, CKCL 564, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.  
E-mail: D.Swinkels@CKCL.azn.nl

vrij gemuteerd K-ras-DNA in de liquor van twee patiënten met LMM. Beide patiënten hadden een adenocarcinoom van de long, waarin een K-ras-mutatie (codon 12: GGT→TGT) kon worden aangetoond. Identieke mutaties werden in het supernatant van de liquor gevonden met behulp van mutant-allel-specifieke amplificatie (MASA) nog voordat bij cytologisch onderzoek maligne cellen werden gezien. We concluderen dat detectie van K-ras-mutaties in de liquor van patiënten met klinische verdenking op LMM een veelbelovende methode is voor (vroeg)diagnostiek van LMM van adenocarcinomen van de long. Omdat K-ras-mutaties bij ongeveer 30% van de longadenocarci-