Low Density Lipoprotein-Heterogenität als prognostischer Marker kardiovaskulärer Erkrankungen

Low density lipoprotein heterogeneity for risk evaluation of cardiovascular disease

Karl Winkler

Abteilung für Klinische Chemie, Universität Freiburg,
Freiburg, Deutschland

Zusammenfassung

Generell ist die Bestimmung von Low Density Lipoprotein-Subfraktionen (LDL-Subfraktionen) zur Aufklärung pathophysiologischer Zusammenhänge im Bereich der vaskulären Medizin und für die Risikoabschätzung kardiovaskulärer Erkrankungen von Bedeutung. Es gibt verschiedene Methoden zur Bestimmung von LDL-Subfraktionen, welche sich unterschiedliche physiko-chemische Eigenschaften der LDL zu Nutze machen. So trennen Ultrazentrifugationsmethoden nach Dichte, die Gradientengelelektrophorese (GGE) und das Magnetresonanzverfahren (NMR) nach Größe auf. Für differentialdiagnostische Zwecke oder bei der routinemäßigen Abschätzung des kardiovaskulären Risikos ist die Analytik der LDL-Subfraktionen derzeit aber wenig sinnvoll. Dies liegt zum einen an den teilweise aufwändigen Techniken, zum anderen an der schlechten Standardisierung der Methoden und der noch offenen klinischen Relevanz der gewonnenen Ergebnisse.

Schlüsselwörter: atherogener Lipoproteinphänotyp (ALP); Gradienten-Gelelektrophorese (GGE); koronare Herzkrankheit (KHK); LDL-Subfraktionen; Magnetresonanzmethode (NMR); präparative Ultrazentrifugation, kleine, dichte LDL.

Abstract

In general, LDL subfractions may be useful to get insight into the pathophysiology of cardiovascular diseases and for risk assessment. There are different methods to separate LDL-subfractions, addressing different properties of the lipoproteins. Ultracentrifugation separates LDL sub-

fractions on the basis of density, whereas gradient gel electrophoresis (GGE) and the nuclear magnetic resonance (NMR) technique separate LDL subfractions by virtue of size. However, at the time being, the analysis of LDL subfractions in the differential diagnostics of lipoprotein disorders or in the assessment of cardiovascular risk does not appear to be useful. This is due to the tedious techniques, the unsatisfactory standardization of methods, and the still unresolved clinical relevance of the results.

Keywords: atherogenic lipoprotein phenotype (ALP); coronary artery disease (CAD); gradient gel electrophoresis (GGE); LDL subfractions; nuclear magnetic resonance (NMR) method; preparative ultracentrifugation; small, dense LDL.

Innerhalb der letzten 50 Jahre wurde weltweit eine große Anzahl epidemiologischer Studien zur Atheroskleroseentstehung durchgeführt. Neben dem Alter und dem Rauchen tragen Störungen des Fettstoffwechsels, sogenannte Dyslipoproteinämien, maßgeblich zum Atheroskleroserisiko bei [1]. Über die Beurteilung der Gesamtkonzentration der Lipide im Serum hinausgehend wird allgemein den *low density lipoproteins* (LDL) eine proatherogene und den *high density lipoproteins* (HDL) eine protektive Wirkung zugeschrieben.

Da die Dichtefraktion der LDL nicht homogen ist, kann man große, weniger dichte von kleinen, dichten (*small, dense*) LDL unterscheiden (Abbildung 1). Erhöhte Konzentrationen kleiner, dichter LDL-Partikel sind mit einem erhöhten Atheroskleroserisiko assoziiert. So kann das Herzinfarktrisiko bei Auftreten kleiner, dichter LDL um bis zu siebenfach erhöht sein [2–7].

Im Vergleich zu großen LDL-Partikeln zeigen kleine, dichte LDL eine verminderte Aufnahme durch den LDL-Rezeptor [8], sind anfälliger für oxidative Modifikation [9] und zeigen eine erhöhte Affinität für Proteoglykane der Gefäßwand [10] sowie die Fähigkeit zur verstärkten Penetration der Gefäßintima [11]. Es gibt allerdings Hinweise darauf, daß auch große LDL-Partikel ein erhöhtes Risiko für die koronare Herzkrankheit (KHK) verursachen

Abbildung 1 Partikelgröße und Lipoproteindichte.

können. Tatsächlich waren in der CARE-Studie große, triglyzeridreiche LDL ein unabhängiger Risikofaktor für KHK [12]. Darüber hinaus treten große, leichte und triglyzeridreiche LDL bei schwangerschaftsassoziierter Hypertonie (Präeklampsie) auf [13]. Dies mag ein Hinweis darauf sein, daß triglyzeridreiche Lipoproteine für kardiovaskuläre Erkrankungen bedeutsam sein können. In der Tat war in einer aktuellen Untersuchung der Triglyzeridgehalt der LDL mit angiographisch diagnostizierter KHK assoziiert [14].

Das Auftreten kleiner, dichter LDL ist oft mit erhöhten Triglyzeridkonzentrationen und niedrigerem HDL-Cholesterin assoziiert. Diese metabolische Situation wird auch als atherogene Triade bzw. atherogener Lipoproteinphänotyp bezeichnet [15]. Allerdings können kleine, dichte LDL auch unabhängig von Triglyzeriden und HDL-Cholesterin eine endotheliale Dysfunktion verursachen [16].

Eine besondere Rolle spielen die LDL-Unterfraktionen beim metabolischen Syndrom und bei Typ-2-Diabetes mellitus.

Heterogenität der Lipoproteine

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, sind LDL-Partikel nicht homogen. Die Heterogenität der LDL wurde vor über 50 Jahren von Gofman et al. zusammen mit dem Konzept postuliert, daß bestimmte Lipoproteinsubklassen eine stärkere Vorhersagekraft für das Auftreten und die Progression der Atherosklerose haben als das Gesamtcholesterin [17]. Krauss und Burke etablierten eine systematische Klassifikation der LDL-Heterogenität, basierend auf Dichte und Flotationseigenschaften sowie auf der LDL-Partikelgröße [18]. Die Entwicklung der klinischen

Bedeutung der LDL-Subfraktionen ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Analytische Ansätze zur Trennung von Lipoproteinfraktionen

Traditionell werden Lipoproteine anhand ihrer Dichte klassifiziert, was die Auftrennung der Hauptlipoproteinfraktionen, namentlich der *very low density lipoproteins* (VLDL; $d < 1.006$ [kg/l]), der *intermediate density lipoproteins* (IDL; $1.006 > d < 1.019$ [kg/l]), der *low density lipoproteins* (LDL $1.019 > d < 1.063$ [kg/l]) und der *high density lipoproteins* (HDL $1.019 < d < 1.21$ [kg/l]) durch Ultrazentrifugation ermöglicht [20].

Die Auftrennung der Gesamt-LDL anhand der Dichte in weitere LDL-Subfraktionen kann ebenfalls mittels Dichtegradientenultrazentrifugation erfolgen. Hierfür existieren verschiedene Methoden, z.B. nach Chapman [21], Griffin [22] und Baumstark [23], mit spezifischen Vor- und Nachteilen, die hier nicht im Detail besprochen werden sollen. Generell ist die Trennung von LDL-Subfraktionen mittels Ultrazentrifugation eine aufwendige und zeitraubende Methode. Aus diesem Grund eignet sie sich kaum für Routineuntersuchungen.

Am häufigsten werden deshalb Methoden zur Analyse der LDL-Subfraktionen angewandt, welche sich auf die LDL-Größe beziehen und weniger aufwändig sind. Hierbei spielen die Gradientengelelektrophorese [24] und die Protonen-NMR-Spektroskopie [25, 26] eine Rolle.

Gradientengelelektrophorese

Die Gradientengelelektrophorese (GGE) trennt LDL-Par-

Tabelle 1 Zeittafel zu LDL-Subfraktionen.

Krauss et al. (1980)	LDL Sf <7 (small and dense LDL) ist bei Männern höher als bei Frauen und ist positiv mit VLDL und negativ mit HDL assoziiert. Es wurde vorgeschlagen, dass das KHK-Risiko mit kleinen, dichten LDL assoziiert ist.
Krauss u. Burke (1982)	Erster Beweis intraindividuelle LDL-Heterogenität. Systematische Klassifikation der LDL aufgrund von Flotationseigenschaften und LDL-Größe.
Austin u. Krauss (1986)	LDL-Subklassen 'Pattern A' und 'Pattern B'. Pattern A ist mit niedrigem HDL und erhöhten Triglyceriden in Familien mit familiär kombinierter Hyperlipidämie (FKH) assoziiert. Pattern B wird als vererbbar beschrieben.
Austin et al. (1988)	LDL Pattern B ist mit einem dreifach höheren Risiko für akuten Myokardinfarkt assoziiert.
Austin et al. (1990)	Der atherogene Lipoproteinphänotyp (ALP) wird als vererbbarer Marker für koronare Herzkrankheit vorgeschlagen.

Modifiziert nach Griffin 1995 [19].

tikel aufgrund des Umstands, daß dichte LDL-Partikel gleichzeitig auch einen geringeren Durchmesser haben. LDL-Partikel wandern solange durch ein immer enger werdendes vernetztes Polyacrylamid-Gradientengel (2–16%), bis das weitere Wandern durch die LDL-Partikelgröße verhindert wird. Kleine, dichte LDL wandern also weiter als große, weniger dichte LDL-Partikel. Die Anwendung dieser Methode führte zur Kategorisierung individueller LDL-Subfraktionsverteilungen in zwei LDL-Subfraktionsmuster, welche durch Densitometrie der Polyacrylamid-Gradientengele bestimmt werden [27]: Ein normales *Pattern A* besteht vornehmlich aus großen LDL (LDL-Durchmesser des Haupt-LDL-Peaks: *peak particle diameter* >25.5 nm), ein pathologisches *Pattern B* hauptsächlich aus kleinen LDL (*peak particle diameter* <25.5 nm) (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2 Verteilung der LDL-Subfraktionen nach Dichte und Partikelgröße.

*Auftrennung der LDL-Subfraktionen nach Dichte wurde durch Dichtegradientenultrazentrifugation erreicht. **Die Bestimmung der LDL-Partikelgröße wurde mittels Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese (2–16%) durchgeführt. Gepunktete Linie: gesunde Frau; unterbrochene Linie: gesunder Mann; durchgezogene Linie: KHK-Patient (Pattern B) [19].

Magnetresonanzmethode (Nuclear Magnetic Resonance – NMR)

Die NMR-Spektroskopie misst das von Lipoproteinmethylgruppen emittierte Signal. Das Signal hängt von der Gesamtzahl terminaler Methylgruppen der Lipide innerhalb des Lipoproteins ab. Hierbei tragen Cholesterinester und Triglyceride im Kern des Lipoproteins mit jeweils drei und Phospholipide bzw. freies Cholesterin in der Lipoproteinoberfläche mit jeweils zwei Methylgruppen zum Signal bei [28]. Unter der Annahme einer sphärischen Gestalt der Lipoproteine hängt die Anzahl der Methylgruppen innerhalb eines Partikels in Annäherung nur vom Durchmesser des Lipoproteinpartikels ab und ist unabhängig von Unterschieden der Lipidkomposition. Unter diesen Umständen ist das Methyl-NMR-Signal jeder Lipoproteinsubklasse ein direktes Maß ihrer Konzentration. Basierend auf empirisch gemessenen Signalamplituden von gereinigten VLDL-, LDL- und HDL-Unterfraktionen unterscheidet die NMR-Methode Signale, welche mit Lipoproteinklassen assoziiert sind. Diese Signale werden als direktes Maß der Konzentration der jeweiligen Lipoproteinklassen betrachtet [26].

Durch NMR entstehen Signale für eine IDL-Fraktion, drei VLDL-, drei LDL- und drei HDL-Fraktionen (Abbildung 3) unterschiedlicher Größe (Tabelle 2). Konversionsfaktoren für Cholesterin bzw. Triglyceride werden zur Berechnung der Lipoproteinsubfraktionskonzentrationen herangezogen. Hierbei wurde die Zusammensetzung der Lipoproteine von Normalpersonen zugrunde gelegt [28].

Klinische Aussagekraft der LDL-Subfraktionierung

Wie schon erwähnt, ist die Unterscheidung zwischen *Pattern A* (große LDL) und *Pattern B* (kleine LDL) klinisch bedeutsam. *Pattern B* kann diagnostiziert werden, wenn der *peak particle diameter* (GGE) oder die durchschnittliche Partikelgröße (NMR) unter dem Schwellenwert von

Abbildung 3 Einteilung der Lipoproteinsubklassen durch die NMR-Methode (nuclear magnetic resonance). HDL = high density lipoproteins; IDL = intermediate density lipoproteins; LDL = low density lipoproteins; VLDL = very low density lipoproteins [29].

25,5 bzw. 20,5 nm liegen. Eine Assoziation zwischen LDL-Größe und dem Auftreten zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse konnte mit NMR [7, 30] und mit GGE [3–5, 31] gezeigt werden.

Bislang ging man davon aus, daß die durch GGE und NMR erhaltenen Informationen austauschbar seien [32]. Eine kürzlich erschienene Untersuchung an 152 Patienten mit Typ-1-Diabetes und 172 Kontrollpersonen zur Vergleichbarkeit von GGE und NMR brachte allerdings ernüchternde Ergebnisse [33]: Der Spearman-Korrelationskoeffizient zwischen beiden Methoden lag bei nur 0,39. Die durchschnittliche Partikelgröße wurde, wie schon vorher bekannt, in der NMR-Methode um 5,38 nm geringer gemessen, allerdings nahm dieser Unterschied mit steigender Partikelgröße zu. Entscheidend war aber, daß weniger als 50% der Patienten, welche in der GGE als *Pattern B* charakterisiert wurden, mit der NMR-Methode als solche erkannt wurden [33]. Die Fähigkeit der NMR-Methode, *Pattern A* von *Pattern B* zu unterscheiden, war hauptsächlich bei Frauen und diabetischen Patienten eingeschränkt [33].

Dies mag daran liegen, daß LDL-Partikel möglicherweise keine sphärische Form aufweisen [34, 35]. Diese Möglichkeit würde bedeuten, daß die Annahme einer sphärischen Gestalt der LDL zur Bestimmung der LDL-

Tabelle 2 NMR-Lipoproteinpartikelgrößen.

Große VLDL (einschließlich Chylomikronen)	> 60 nm
Mittlere VLDL	35–60 nm
Kleine VLDL	27–35 nm
IDL	23–27 nm
Große LDL	21.3–23 nm
Mittlere LDL	19.8–21.2 nm
Kleine LDL	18.3–19.7 nm
Große HDL	8.8–13 nm
Mittlere HDL	8.2–8.8 nm
Kleine HDL	7.3–8.2 nm

Die NMR-Methode misst etwa 5 nm kleinere Durchmesser für IDL und LDL als die GGE-Methode [28].

Größe, wie sie der NMR-Methode zugrunde liegt, fehlerhaft ist [33].

Dichtegradientenultrazentrifugation

Wie schon erwähnt sind Ultrazentrifugationsmethoden für die Routineanwendung im Allgemeinen wenig geeignet, besitzen aber aufgrund ihrer höheren Auflösung eine bessere Aussagekraft als andere Methoden. Darüber hinaus erlaubt die präparative Auftrennung auch Aussagen über die Komposition der erhaltenen LDL-Subfraktionen. Zu berücksichtigen ist hierbei allerdings, daß aufgrund der höheren Auflösung durch die Ultrazentrifugation das Einfrieren der Serumproben nicht unproblematisch ist, da dieses die Eigenschaften von Lipoproteinen verändern kann [36].

Auch mittels Ultrazentrifugation wurden unabhängige Assoziationen von LDL-Subfraktionen mit der KHK gefunden [2, 37]. Unter Verwendung der Methode von Baumstark (Endpunkt-Dichtegradientenultrazentrifugation) [23] konnte der Schweregrad angiographischer Veränderungen von Koronarpatienten mit Ein-, Zwei- oder Dreifäßerkrankung mit dem Auftreten von dichten LDL-Unterfraktionen assoziiert werden [38]. Bei dieser Methode ist von Bedeutung, daß die Gesamt-LDL durch einen Gleichgewichtsdichtegradienten in LDL-Subfraktionen aufgetrennt wird, was zu gut reproduzierbaren Ergebnissen führt. Es werden sechs LDL-Subfraktionen unterschieden, wobei LDL-1 die leichteste und LDL-6 die dichteste LDL darstellt. Als atherogen werden bei dieser Methode die LDL-5 und LDL-6 angesehen. Diese werden auch als dichte (dense) LDL (dLDL) bezeichnet [39]. Da jedes apoB-100 tragende Lipoprotein (VLDL, IDL und LDL) nur ein apoB-100-Molekül trägt, werden die Konzentrationen der LDL-Subfraktionen in apoB-100 [mg/l] angegeben (Abbildung 4). Dies ergibt ein direktes Maß der Anzahl von Lipoproteinpartikeln im jeweiligen Dichtebereich. Als dLDL-Profil wird eine Konzentration von apoB-100 in den Fraktionen LDL-5 plus LDL-6 von > 25 [mg/dl] angesehen [39].

Wann ist die Messung von LDL-Subfraktionen sinnvoll?

Klassischerweise spielen kleine, dichte LDL im Rahmen des atherogenen Lipoproteinphänotyps eine Rolle, wie er häufig bei Typ-2-Diabetes und metabolischem Syndrom vorliegt [40, 41]. Die Prävalenz eines dLDL-Profiles bei Typ-2-Diabetes kann bei bis zu 80% liegen (Abbildung 4) [39]. Allerdings scheint das KHK-Risiko eines Patienten mit Typ-2-Diabetes dem von nichtdiabetischen Infarktpatienten zu entsprechen [42]. In diesem Fall ist der zusätzliche diagnostische Nutzen einer Bestimmung der LDL-Subfraktionen für die Therapieentscheidung fraglich, da ohnehin lipidsenkend therapiert werden sollte. Auch ist bei erhöhten Triglyzeriden und erniedrigtem HDL das

Abbildung 4 Prävalenz eines Dichte-LDL-Profiles in Patienten mit Typ-2-Diabetes. Nach [39].

Vorliegen von dichten LDL sehr wahrscheinlich, weswegen auch hier ein zusätzlicher diagnostischer Nutzen eher nicht gegeben ist.

Anders sieht die Situation möglicherweise bei nichtdiabetischen Personen mit normalen Lipidwerten aus: Bei normolipidämischen Patienten mit normalen Lipidwerten, aber Hypertonie lag in einer eigenen Untersuchung in etwa 60% der Fälle ein dLDL-Profil vor, wobei die Modifizierung dieses dLDL-Profiles unabhängig von Triglyceriden und HDL-Cholesterin möglich war [43]. Hier kommt eventuell der Analytik der LDL-Subfraktionen zukünftig eine diagnostische Bedeutung zu.

Schlussfolgerung

Generell ist die Bestimmung von LDL-Subfraktionen zur Aufklärung pathophysiologischer Zusammenhänge im Bereich der vaskulären Medizin von Bedeutung. Für diagnostische Zwecke ist sie aber derzeit wenig sinnvoll. Dies liegt zum einen an den teilweise aufwändigen Techniken und zum anderen an der schlechten Standardisierung der Methoden und der noch offenen klinischen Relevanz der gewonnenen Ergebnisse.

Literatur

1. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* 2002;105:310–5.
2. Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW, Thomson J, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J. 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* 1994;106:241–53.

3. Stampfer MJ, Krauss RM, Ma J, Blanche PJ, Holl LG, Sacks FM, Hennekens CH. A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction. *J Am Med Ass* 1996;276:882–8.
4. Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *J Am Med Ass* 1996;276:875–81.
5. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* 1997;95:69–75.
6. Berneis K, Krauss R. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 2002; 43:1363–79.
7. Blake GJ, Otvos JD, Rifai N, Ridker PM. Low-density lipoprotein particle concentration and size as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy as predictor of cardiovascular disease in women. *Circulation* 2002; 106:1930–7.
8. Nigon F, Lesnik P, Rouis M, Chapman MJ. Discrete sub-species of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *J Lipid Res* 1991;32:1741–53.
9. DeJager S, Bruckert E, Chapman MJ. Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 1993;34:295–308.
10. Anber V, Griffin BA, McConnell M, Packard CJ, Shepherd J. Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis* 1996; 124:261–71.
11. Nordestgaard BG, Nielsen LB. Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:252–7.
12. Campos H, Moye LA, Glasser SP, Stampfer MJ, Sacks FM. Low-density lipoprotein size, pravastatin treatment, and coronary events. *J Am Med Ass* 2001;286:1468–74.
13. Winkler K, Wetzka B, Hoffmann MM, Friedrich I, Kinner M, Baumstark MW, Zahradnik H-P, Wieland H, März W. Triglyceride-rich lipoproteins are associated with hypertension in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1162–6.
14. März W, Scharnagl H, Winkler K, Tiran A, Nauck M, Boehm BO, Winkelmann BR. Low Density Lipoprotein Triglycerides Associated with Low Grade Systemic Inflammation, Adhesion Molecules and Angiographic Coronary Disease. (The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study). *Circulation* (im Druck) 2004.
15. Austin MA, King M-C, Vranizian KM, Krauss RM. Atherogenic Lipoprotein Phenotype: A proposed Genetic Marker for Coronary Heart Disease Risk. *Circulation* 1990;82:495–506.
16. Vakkilainen J, Makimattila S, Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Lahdenpera S, Groop PH, Taskinen MR, Yki-Jarvinen H. Endothelial dysfunction in men with small LDL particles. *Circulation* 2000;102:716–21.
17. Gofman J, Jones H. Blood lipids and human atherosclerosis. *Circulation* 1950;11:161–78.
18. Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 1982;23:97–104.
19. Griffin BA. Low-density lipoprotein heterogeneity. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1995;9:687–703.

20. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human plasma. *J Clin Invest* 1955;34:1345–53.
21. Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res* 1981;22:339–58.
22. Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis* 1990;83:59–67.
23. Baumstark MW, Kreutz W, Berg A, Frey I, Keul J. Structure of human low-density lipoprotein subfractions, determined by X-ray small-angle scattering. *Biochim Biophys Acta* 1990;1037:48–57.
24. Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1986;128:417–31.
25. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW. Quantification of plasma lipoproteins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Chem* 1991;37:377–86.
26. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distribution from a single, rapid measurement. *Clin Chem* 1992;38:1632–8.
27. Austin M, Krauss RM. Genetic control of low-density-lipoprotein subclasses. *Lancet* 1986;2:592–5.
28. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, Shalauova I, Cupples LA, Parise H, D'Adostino RB, Wilson PWF, Schaefer EJ. Sex and Age Differences in Lipoprotein Subclasses Measured by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: The Framingham Study. *Clin Chem* 2004;50:1189–200.
29. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Cromwell WC. Measurement issues related to lipoprotein heterogeneity. *Am J Cardiol* 2002;90:22i–29i.
30. Soedamah-Muthu SS, Chang YF, Otvos JD, Evans RW, Orchard TJ. Lipoprotein subclass measurements by nuclear magnetic resonance spectroscopy improve the prediction of coronary artery disease in type 1 diabetes. A prospective report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia* 2003;46:674–82.
31. St. Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard PM, Depres JP, Lamarche B. Comparison of various electrophoretic characteristics of LDL particles and their relationship to the risk of ischemic heart disease. *Circulation* 2001;104:2295–9.
32. LipoScience I. bazbauNMR LipoProfile Test: nuclear resonance imaging lipoprotein coronary heart disease blood test. Raleigh, NC. (Accessed February 20, 2004, at <http://www.liposcience.com/www.lipoprofile.com>. 2003.
33. Witte DR, Taskinen MR, Perttunen-Nio H, vanTol A, Livingstone S, Colhoun HM. Study of agreement between LDL size as measured by nuclear magnetic resonance and gradient gel electrophoresis. *J Lipid Res* 2004;45:1069–76.
34. Lunin VY, Lunina NL, Ritter S, Frey I, Berg A, Diederichs K, Podjarny AD, Urzhumtsev A, Baumstark MW. Low-resolution data analysis for low-density lipoprotein particle. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2001;57:108–21.
35. Teerlink T, Scheffer PG, Bakker SJ, Heine RJ. Combined data from LDL composition and size measurement are compatible with discoid particle shape. *J Lipid Res* 2004;45:954–88.
36. Rumsey SC, Galeano NF, Arad Y, Deckelbaum RJ. Cryopreservation with sucrose maintains normal physical and biochemical properties of human plasma low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1992;33:1551–61.
37. Skoglund-Andersson C, Tang R, Bond MG, de Faire U, Hamsten A, Karpe F. LDL particle size distribution is associated with carotid intima-media thickness in healthy 50-year-old men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2422–30.
38. Baumstark M, Berg A, Halle M, Rensing U, Roskamm H, Keul J. Small dense LDL are a major determinant for the severity of angiographically assessed CAD, even in groups with similar triglyceride levels. *Atherosclerosis* 1994;109:29–30.
39. Winkler K, Abletshauser C, Hoffmann MM, Friedrich I, Baumstark MW, Wieland H, März W. 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* 2002;87:5485–90.
40. Reaven GM, Chen Y-DI, Jeppesen J, Maheux P, Krauss RM. Insulin Resistance and Hyperinsulinemia in Individuals with Small, Dense, Low Density Lipoprotein Particles. *J Clin Invest* 1993;92:141–6.
41. Austin MA, Edwards KL. Small, dense low density lipoprotein, the insulin resistance syndrome and noninsulin-dependent diabetes. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:167–71.
42. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction [see comments]. *N Engl J Med* 1998;339:229–34.
43. Winkler K, Konrad T, Füllert S, Friedrich I, Destani R, Baumstark MW, Krebs K, Wieland H, März W. Pioglitazone Reduces Atherogenic Dense LDL Particles in Nondiabetic Patients With Arterial Hypertension. A double-blind, placebo-controlled study. *Diabetes Care* 2003;26:2588–94.