

# İNSAN VE BAZI EVCİL HAYVAN TÜRLERİNİN SERUM $\beta$ +PRE- $\beta$ LİPOPROTEİNLERİNİN HEPARİN/MnCl<sub>2</sub> PRESİPİTASYON METODU İLE KARŞILAŞTIRMALI İZOLASYONLARI\*

Tülay İLERİ<sup>1</sup>Tayfun GÜLDÜR<sup>2</sup><sup>1</sup>Akdeniz Üniversitesi Burdur Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Burdur – TÜRKİYE<sup>2</sup>İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Malatya – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 25.06.2002

Comparative Isolation of Serum  $\beta$  + Pre- $\beta$  Lipoproteins of Human and Various Domestic Animal Species By Heparin/MnCl<sub>2</sub> Precipitation Method

## Summary

Lipoproteins are water-soluble complexes through which fats and lipids are transported between the various tissues for storage and utilization. Association of lipoproteins with risk of coronary heart disease and various types of dyslipoproteinemias necessitate the quantification of the individual lipoprotein classes. One of the most commonly used techniques for the separation of  $\beta$  and pre- $\beta$  lipoproteins is the precipitation technique. However, none of the lipoprotein separation techniques used in laboratories has been developed for use in animal lipoproteins. It was suggested that lipoprotein separation procedures might require modification before they are applied to the plasma of a given animal species. Therefore, the present study was undertaken to compare the concentrations of heparin/MnCl<sub>2</sub> necessary in order to precipitate  $\beta$  + pre- $\beta$  lipoproteins of human and various animal sera. The lipoproteins precipitated were separated and identified by agarose gel electrophoresis. In accordance with the original heparin/MnCl<sub>2</sub> precipitation method being commonly used for human serum, 200 IU heparin / 46 $\mu$ mol MnCl<sub>2</sub> yielded complete precipitation of  $\beta$  + pre- $\beta$  lipoproteins in sera from all the animal species investigated except bovine and chicken. Bovine serum required approx. 2 times more heparin/MnCl<sub>2</sub> for the precipitation of these lipoprotein classes whereas chicken serum required half of the reagent concentration as compared to human serum. However, complete dissociation and electrophoretic separation of the precipitated lipoproteins by the heparin/MnCl<sub>2</sub> method were not achieved. It was concluded therefore that the concentrations of polyanion/divalent cation used for the precipitations of serum  $\beta$  + pre- $\beta$  lipoproteins differ between human and several animal species. The existing differences might be attributed to the variations in charge densities of lipoproteins' surface as well as to dissimilarities in lipid compositions of the lipoproteins among species.

**Key Words:** Lipoprotein separation, precipitation, agarose gel electrophoresis

## Özet

Lipoproteinler, çeşitli dokular arasında depolanma ve kullanım için yağları ve lipitleri nakleden suda-çözünür komplekslerdir. Lipoproteinlerin koroner arter hastalığı riski ve çeşitli tip dislipoproteinemiler ile olan bağlantısı lipoprotein fraksiyonlarının miktar tayinini gerekli kılmaktadır.  $\beta$  ve pre- $\beta$  lipoproteinlerin izolasyonu için en yaygın olarak kullanılan tekniklerden bir tanesi presipitasyon tekniğidir. Bununla beraber laboratuvarında kullanılan lipoprotein ayırım tekniklerinden hiçbiri hayvan lipoproteinlerinde kullanım için geliştirilmemiştir. Bu lipoprotein ayırım yöntemlerinin mevcut hayvan türlerinin plazmasına uygulanmadan önce muhtemelen modifiye edilmesi gerektiği ileri sürülmüştür. Bu nedenle mevcut çalışma, insan ve çeşitli hayvan serumlarındaki  $\beta$  + pre- $\beta$  lipoproteinleri çöktürmek için gerekli heparin/MnCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarını karşılaştırmak üzere gerçekleştirildi. Bu amaçla, ilk olarak insan serum lipoproteinleri ve daha sonra çeşitli hayvan türlerinin serum  $\beta$  + pre- $\beta$  lipoproteinleri heparin / MnCl<sub>2</sub> presipitasyon metodu kullanılarak çöktürüldü. Çöktürülen lipoproteinler agaroz jel elektroforez ile tanımlandı. İnsan serumu için sıkça kullanılan orijinal heparin/MnCl<sub>2</sub> çöktürme metodu ile uyumlu olarak 200 IU heparin/MnCl<sub>2</sub> çalışmada mevcut hayvan türlerinin (sığır ve tavuk hariç) serum  $\beta$  + pre- $\beta$  lipoproteinlerini tam olarak çöktürdü. Oysa, sığır serumu aynı lipoprotein sınıflarının çöktürülmesi için insan serumunda kullanılan yaklaşıp 2 kat fazla heparin/MnCl<sub>2</sub> gerektirirken tavuk serumu insandakinin

\* Bu çalışma doktora tezinin bir bölümünden özet olup, FÜNAP (Proje No: 262) tarafından desteklenmiştir.



yarısı konsantrasyonu gerektirdi. Bununla birlikte, heparin/MnCl<sub>2</sub> metodu ile presipite edilen lipoproteinlerin tam bir dissosiyasyonu ve elektroforetik separasyonu elde edilemedi. Bu nedenle, serum  $\beta$  + pre- $\beta$  lipoproteinlerin presipitasyonu için kullanılan polianyon/divalent katyon konsantrasyonlarının insan ve çeşitli hayvan türleri arasında farklılık gösterdiği sonucuna varıldı. Türler arasındaki mevcut farklılıklar, muhtemelen lipoproteinlerin türler arasındaki lipit kompozisyonlarındaki ve yüzey yük yoğunluklarındaki varyasyonlardan kaynaklanmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Lipoprotein separasyonu, presipitasyon, agaroz jel elektroforez

## Giriş

Plazma lipoproteinleri, spesifik proteinler (apolipoproteinler) ve lipidler (kolesterol, kolesterol esterleri, fosfolipidler ve triaçilgliseroller) içeren suda çözünür komplekslerdir (1,3,4). Boyut, kimyasal kompozisyon ve dansitedeki farklılıklar lipoproteinlerin ayırılmalarını mümkün kılmaktadır (6). Plazma lipoproteinleri elektroforetik mobilitelerine göre;  $\beta$  lipoproteinler (orijinde kalır), pre- $\beta$  (VLDL : Çok Düşük Dansiteli Lipoproteinler),  $\beta$  (LDL: Düşük Dansiteli Lipoproteinler) ve  $\alpha$  (HDL: Yüksek Dansiteli Lipoproteinler) lipoproteinler olarak sınıflandırılmaktadırlar (3). Lipoproteinlerin, insanlarda koroner arter hastalığı riski ve çeşitli dislipoproteinemiler ile ayrıca hem insanlarda hem de hayvanlarda lipit metabolizmasının değişik hastalıkları ile (ketozis, hepatik lipidozis, pankreatitis, diabetes mellitus, vb) olan bağlantısı farklı lipoprotein sınıflarının miktar tayinlerini ve kompozisyonel analizlerini gerekli kılmaktadır. Bu analizler, bu tür lipit bağlantılı hastalıkların teşhisinde büyük öneme sahiptir (7,10). Lipoprotein sınıflarının bu amaçlarla izolasyonu için çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Lipoproteinler; ultrasantrifügasyon, polianyon / divalent katyonlar ve nötral polimerler ile presipitasyon, elektroforezis, kolon kromatografisi veya immunolojik prosedürlerle serum ya da plazmadan izole edilebilmektedirler (7). En sık kullanılan lipoprotein separasyon tekniklerinden biri de presipitasyon yöntemidir. Presipitasyon yöntemi, kolaylığı, kısa sürede tamamlanabilmesi ve ucuzluğu sebebiyle sıkça kullanılmaktadır. Lipoproteinlerin, heparin, dekstran sülfat ve sodyum fosfotungstat gibi polianyonlar ve nötral polimerler ile moleküler kompleksler meydana getirebilme özelliklerinden yararlanılarak lipoproteinlerin serumdan presipitasyon yolu ile izolasyonları sağlanmıştır (11). Günümüzde HDL-kolesterol analizi için sık kullanılan metotlardan biri polianyon / divalent katyonlar ile apo B içeren lipoproteinlerin ( $\beta$ +pre- $\beta$ ) presipitasyonudur. Presipitasyon sonrası süpernatantta HDL-kolesterolünün enzimatik analizi yapılmaktadır. İnsan plazmasından lipoproteinlerin izolasyonu için geliştirilen tekniklerin, lipoprotein sınıflarının konsantrasyon ve kompozisyonlarının türler arasında farklılıklar

göstermesi nedeniyle her tür için geçerli olmayabileceği ileri sürülmüştür (14,15). Hayvanlarda lipoproteinler konusunda yapılan çoğu çalışmalarda insan lipoproteinlerini izole etmek için geliştirilen teknikler kullanılmıştır (16). Türler arasında karşılaştırmaya yönelik yeterli sayıda araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu amaçla, insan serum  $\beta$  + pre- $\beta$  lipoproteinlerinin izolasyonları için kullanılan heparin / MnCl<sub>2</sub> presipitasyon yöntemi aynı amaçla bazı hayvan türlerinin serumuna uygulandı. Çöktürülen lipoprotein fraksiyonları agaroz jel elektroforez ile tanımlandı. İnsan ve hayvan serum  $\beta$  + pre- $\beta$  lipoproteinlerinin izolasyonları için gerekli heparin/MnCl<sub>2</sub> konsantrasyonları karşılaştırıldı.

## Materyal ve Metot

**Heparin/MnCl<sub>2</sub> Presipitasyon:** Heparin/MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O ile serum  $\beta$ +pre- $\beta$  lipoproteinlerinin presipitasyonu Naito (22) metoduna göre gerçekleştirildi. Presipitatlar 0,25 ml 0,5 M sodyum sitrat ve 1 ml 0,15 M NaCl'de çözüldü. Çözülen presipitat 1 gece +4°C'de NaCl/azid (8,77g NaCl, 0,13 g sodyum azid, 0,372 g Na<sub>2</sub>EDTA /L, pH 7,3 ) solüsyonuna karşı diyaliz edildi. Bu şekilde sodyum sitrat ve Mn<sup>+2</sup> çözünen presipitatdan uzaklaştırıldı (4).

Kullanılan presipitasyon metodu insan serumuna uygulanarak, en etkin şekilde  $\beta$ +pre- $\beta$  lipoproteinleri çöktüren konsantrasyon elektroforetik olarak tespit edildi. Daha sonra aynı metotlar sırasıyla, sığır, koyun, keçi, kedi, köpek, at, tavuk serumlarına uygulandı. Bu uygulama sırasında insan serum lipoproteinleri için geçerli olan prosedürdeki ayıraç konsantrasyonu baz alındı. Orijinal prosedürdeki ayıraç konsantrasyonu x1 kabul edildi ve x0,5, x1, x2, x3 konsantrasyonlarda ayıraç ilave edildi. Ayrılan presipitatlar ve süpernatantlar agaroz jel elektroforeze tabi tutuldu.

**Agaroz Jel Elektroforezis:** Lipoproteinlerin agaroz jel elektroforezi Hoefer jel elektroforez ünitesinde (Hoefer SE 250 Hoefer Scientific Instruments, ABD) tris-barbital tamponu (pH 8,6) kullanılarak gerçekleştirildi (24). %0,8'lik 1.5 mm

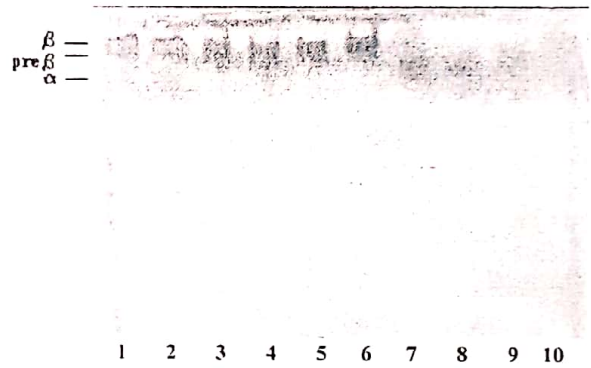
kalınlığındaki jeller için 15 mA/jel de (sabit amperaj) yaklaşık 36 V'da 1 saat 30 dak. elektroforez işlemi uygulandı. Kuyucuklara insan serumundan direkt olarak 9 µL ve diğer hayvan türlerinin serumlarından 15 µL ilave edildi. Presipitatlar ve süpernatantlar ise kuyucuklara yerleştirilmeden önce örnek tamponuyla (16 ml 0,75mM barbital tampon (pH 8,6), 5 ml gliserol, 0,1 ml %1 brom fenol blue/50mL ile) muamele edildi. 100 µL presipitat ve 200 µL süpernatant için 50 µL örnek tampon solüsyonu ilave edildi. Kuyucuklara insan serum lipoprotein presipitatlarından 15µL, süpernatantlarından 20 µL, diğer hayvan türlerinin serum lipoprotein presipitat ve süpernatantlarından 40 µL ilave edildi. Her jelin ilk kuyucuğuna insan serumu referans olarak uygulandı. Elektroforez sonrası jeller, etanol / asetik asit / su 60:10:30 (v/v) karışımında 10 dak. tespit edildi. Tespit sonrası 30 dak. 60 °C de kurutuldu. Kuruyan jeller Fat Red 7B boyasında boyandı (3,23). Jeller distile su/metanol (4:1, v/v) karışımında 1 gece bekletildi (18) ve fotoğrafları çekildi.

### Bulgular

İnsan ve çeşitli hayvan türlerinin heparin/MnCl<sub>2</sub> muamelesi ile çöktürülen serum β+pre-β lipoproteinlere (presipitat) ve çöktürülmemiş lipoproteinlere (süpernatant) ait agaroz jel elektroforetogramları Şekil 1-8'de görülmektedir. Ayrıca hem presipitat ve hem de süpernatantın agaroz jel elektroforezi sonucunda jel üzerinde tespit edilen lipoproteinler +, tespit edilemeyenler ise - şeklinde göz ile değerlendirilerek oluşturulan veriler Tablo 1'de belirtilmiştir.

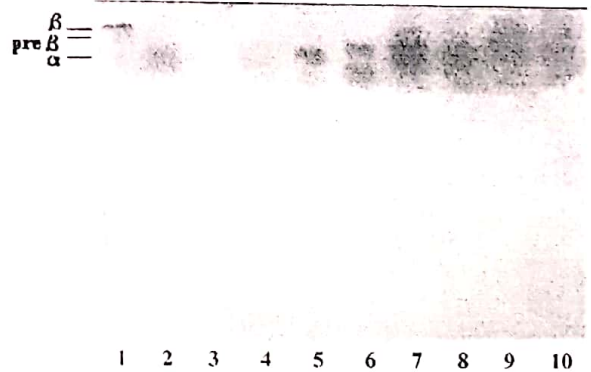
*Heparin/MnCl<sub>2</sub> Presipitasyon Yöntemi ile Serum β+pre-β Lipoproteinlerinin İzolasyonları:* Sığır ve tavuk haricinde, insan ve diğer hayvan türlerinin serum β + pre-β lipoproteinleri x1 konsantrasyondaki heparin/MnCl<sub>2</sub> (200 IU heparin/ 46mmol/L MnCl<sub>2</sub>) ile tam olarak çöktürüldü. Bu numunelerde artan ayıraç konsantrasyonuna bağlı olarak süpernatantlarda azalan α bant yoğunluğunu doğrular nitelikte presipitatlarda giderek artan ayrı bir α bandı tespit edilemedi. Sığır serum β+pre-β lipoproteinleri x1 konsantrasyonda çok az presipite olurken, x3'de (600 IU heparin/110mmol/L MnCl<sub>2</sub>) ise β+pre-β bandına eşlik eden bir α bandının varlığı tespit edildi. Böylelikle x2 ayıraç konsantrasyonunun (400 IU heparin/84 mmol/L MnCl<sub>2</sub>) sığır serum β+pre-β lipoproteinlerinin çöktürmek için yeterli olduğu görüldü. Tavuk serumunda x0.5, x1, x2 ve x3 presipitatların elektroforetogramları arasında yoğunluk açısından belirgin bir fark görülmesinin rağmen süpernatantlarda giderek azalan α bandı

tespit edildi. x0.5'in süpernatantında bile β+pre-β bandı mevcut olmadığından tavuk serum β+pre-β lipoproteinlerini çöktürmek için x0.5 konsantrasyonun (100 IU heparin/23 mmol/L MnCl<sub>2</sub>) yeterli olduğu sonucuna varıldı. β+pre-β lipoprotein bantlarının tam rezolüsyonu insan haricindeki türlerde belirlenemedi. Sığır hariç, artan ayıraç konsantrasyonuna bağlı olarak çöken β+pre-β lipoproteinlerle birlikte α lipoproteinlerin kopresipite olduğu gözlemlendi. Sığırdan ise artan ayıraç konsantrasyonuna paralel olarak x3 presipitatlarda β+pre-β lipoproteinlerle birlikte presipite olan α lipoproteinler ayrı bir bant halinde görüldü.



Şekil 1. Heparin (H) presipitasyon metodu ile izole edilen insan serum β+pre-β ve α lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforetogramı

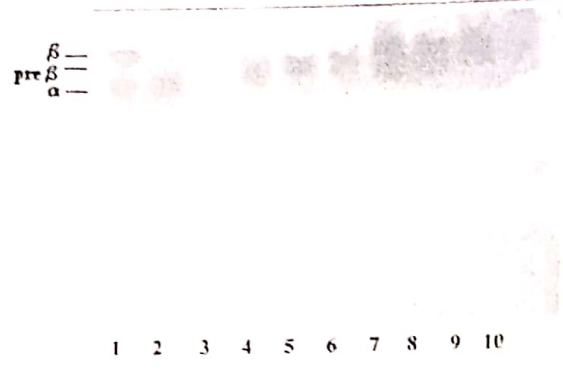
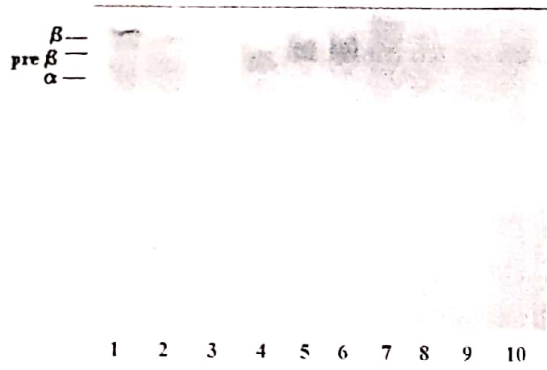
1,2: İnsan serumu 3: H presipitat (x0.5) 4: H presipitat (x1) 5: H presipitat (x2) 6: H presipitat (x3) 7: H süpernatant (x0.5) 8: H süpernatant (x1) 9: H süpernatant (x2) 10: H süpernatant (x3)



Şekil 2. Heparin (H) presipitasyon metodu ile izole edilen sığır serum β+pre-β ve α lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforetogramı

1: İnsan serumu 2: Sığır serumu 3: H presipitat (x0.5) 4: H presipitat (x1) 5: H presipitat (x2) 6: H presipitat (x3) 7: H süpernatant (x0.5) 8: H süpernatant (x1) 9: H süpernatant (x2) 10: H süpernatant (x3)





Şekil 3. Heparin (H) presipitasyon metodu ile izole edilen koyun serum  $\beta$ +pre- $\beta$  ve  $\alpha$  lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforetogramı

1: İnsan serumu 2: Koyun serumu 3: H presipitat (x0.5) 4: H presipitat (x1) 5:H presipitat (x2) 6: H presipitat (x3) 7:H süpernatant (x0.5) 8:H süpernatant (x1) 9: H süpernatant (x2) 10: H süpernatant (x3)

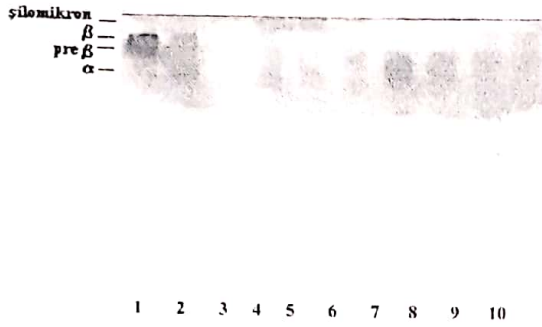
Şekil 4. Heparin (H) presipitasyon metodu ile izole edilen keçi serum  $\beta$ +pre- $\beta$  ve  $\alpha$  lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforetogramı

1: İnsan serumu 2:Keçi serumu3:H presipitat (x0.5)4:H presipitat (x1) 5:H presipitat (x2) 6: H presipitat (x3) 7: H süpernatant (x0.5) 8: H süpernatant (x1) 9: H süpernatant (x2) 10: H süpernatant (x3)

Tablo1. Heparin/MnCl<sub>2</sub> presipitasyon yöntemleri ile izole edilen çeşitli hayvan serum lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforetogramlarındaki bant yoğunluklarının göz ile değerlendirilmesi

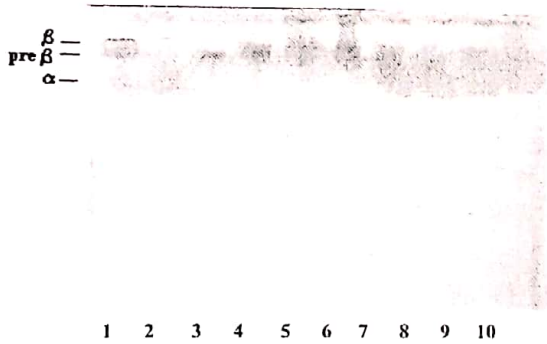
		H e p a r i n / M n C l <sub>2</sub>								
		Presipitat		Süpernatant		Presipitat		Süpernatant		
		$\beta$ +pre- $\beta$	$\alpha$	$\beta$ +pre- $\beta$	$\alpha$	$\beta$ +pre- $\beta$	$\alpha$	$\beta$ +pre- $\beta$	$\alpha$	
İnsan	x0.5	+	-	+	+	x0.5	-	-	-?	+
	x1*	+	-	-	+	Kedi x1*	+	-	-	+
	x2	+	-	-	+	x2	+	-	-	+
	x3	+	-	-	+	x3	+	+	-	+
Sığır	x0.5	-	-	-?	+	Köpek x0.5	+	-	+	+
	x1	+	-	-	+	x1*	+	-	-	+
	x2*	+	-	-	+	x2	+	-	-	+
	x3	+	+	-	+	x3	+	-	-	+
Koyun	x0.5	-	-	+	+	At x0.5	-	-	+?	+
	x1*	+	-	-?	+	x1*	+	-	-	+
	x2	+	-	-	+	x2	+	-	-	+
	x3	+	-	-	+	x3	+	-	-	+
Keçi	x0.5	-	-	+	+	Tavuk x0.5*	+	-	-	+
	x1*	+	-	-	+	x1	+	-	-	+
	x2	+	-	-	+	x2	+	-	-	+
	x3	+	-	-	+	x3	+	-	-	+

\*: İnsan ve çeşitli hayvan türlerinde serum  $\beta$ +pre- $\beta$  lipoproteinlerini tam olarak çöktürmek için gerekli ideal ayırma konsantrasyonları



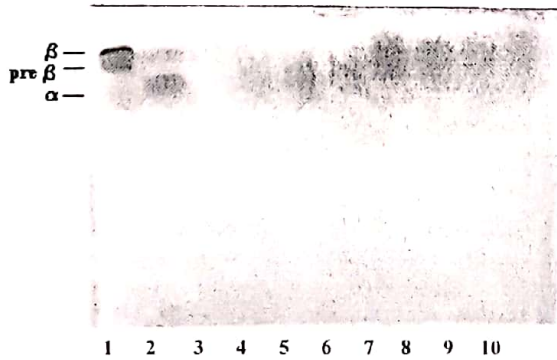
Şekil 5. Heparin (H) presipitasyon metodu ile izole edilen kedi serum  $\beta$ +pre- $\beta$  ve  $\alpha$  lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforetogramı

1: İnsan serumu 2: Kedi serumu 3: H presipitat (x0.5) 4: H presipitat (x1) 5: H presipitat (x2) 6: H presipitat (x3) 7: H süpernatant (x0.5) 8: H süpernatant (x1) 9: H süpernatant (x2) 10: H süpernatant (x3)



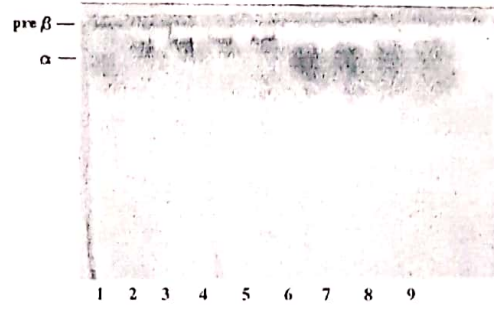
Şekil 6. Heparin (H) presipitasyon metodu ile izole edilen köpek serum  $\beta$ +pre- $\beta$  ve  $\alpha$  lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforetogramı

1: İnsan serumu 2: Köpek serumu 3: H presipitat (x0.5) 4: H presipitat (x1) 5: H presipitat (x2) 6: H presipitat (x3) 7: H süpernatant(x0.5) 8: H süpernatant(x1) 9: H süpernatant (x2) 10: H süpernatant (x3)



Şekil 7. Heparin (H) presipitasyon metodu ile izole edilen insan serum  $\beta$ +pre- $\beta$  ve  $\alpha$  lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforetogramı

1: İnsan serumu 2: At serumu 3: H presipitat (x0.5) 4: H presipitat (x1) 5: H presipitat (x2) 6: H presipitat (x3) 7: H süpernatant (x0.5) 8: H süpernatant (x1) 9: H süpernatant (x2) 10: H süpernatant (x3)



Şekil 8. Heparin (H) presipitasyon metodu ile izole edilen tavuk serum  $\beta$ +pre- $\beta$  ve  $\alpha$  lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforetogramı

1: Tavuk serumu 2: H presipitat (x0.5) 3: H presipitat (x1) 4: H presipitat (x2) 5: H presipitat (x3) 6: H süpernatant (x0.5) 7: H süpernatant (x1) 8: H süpernatant (x2) 9: H süpernatant (x3)

### Tartışma

Heparin, bir takım polisakkarit zincirlerinin yaygın bir protein çekirdeğe bağlandığı klasik bir proteoglikandır. Heparin ticari olarak sığır akciğer ya da domuz intestinal mukozasından elde edilir. Moleküler ağırlığı 6000-30.000 Da arasındadır. Glukuronik asit, iduronik asit ve glukozamin monosakkaritlerinin tekrarlanması ile oluşur (19). Aynı zamanda bir polianyon olan heparin üzerindeki negatif yüklü grupların, lipoproteinlerin apolipoproteinleri üzerindeki pozitif yüklü gruplarla etkileşime girdiği ve divalent metal iyonlarının ( $Mn^{+2}$  vb) da lipoproteinlerdeki negatif yüklü gruplarla (fosfolipidler gibi) birleşerek suda çözünmez kompleks oluşumunu kolaylaştırdığı bildirilmiştir (28). Heparin/ $MnCl_2$  presipitasyon metodu insanlarda yaygın olarak HDL kolesterol ölçümünde kullanılmaktadır. Bu amaçla serum  $\beta$ +pre- $\beta$  lipoproteinleri heparin ile çöktürülerek süpernatantta kalan HDL kolesterolü tespit edilmektedir (2,8,12,13,20,21,27). Buna karşın lipemik serumdan apo B içeren lipoproteinlerin nakli için heparin/ $MnCl_2$  metodunun etkinliğinin düşük olduğu bildirilmiştir (12). 46 mmol/L  $Mn^{+2}$ 'nin serum örnekleri için yeterli olmasına rağmen, plazma ve lipemik serumlar için 92 mmol/L  $Mn^{+2}$ 'nin elverişli olduğu ileri sürülmüştür (27). Bunun sebebi EDTA içeren plazmada EDTA ile  $Mn^{+2}$  divalent katyonu şelat oluşturduğundan heparin- $Mn^{+2}$  metodunda 2 kat daha fazla Mn gerekmesidir. Serum örneklerinin çöktürülmesinde 92 mmol/L  $Mn^{+2}$  kullanımının HDL'in bir miktar kopresipitasyonuna sebep olduğu, 46 mmol/L  $Mn^{+2}$  ile bu kopresipitasyonun daha az olduğu bildirilmiştir (13). Lopes-Virella ve ark (20) heparin- $Mn^{+2}$  ile  $\beta$ +pre- $\beta$  lipoproteinlerin presipitasyonunda heparinin miktarının biyolojik kaynağının ve her bir yeni üretiminin aynı etkiye



sahip olmadığını ve maksimum presipitasyon için standardize edilmesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir.

Mevcut çalışmada Naito (22)'nin metoduna göre 46 mmol/L heparin/MnCl<sub>2</sub> ile serum β+pre-β lipoproteinleri çöktürüldü ve presipitasyonun etkinliği agaroz jel elektroforez ile gösterildi. Elektroforetik görünümde presipitasyon sonrası β+pre-β lipoproteinlerin mobiliteilerinin değiştiği gözlemlendi. Bu da heparin/MnCl<sub>2</sub> ile bu lipoproteinlerin kompleks teşkil ettiğini göstermektedir. Aynı şekilde artan ayıraç konsantrasyonunda (x2, x3) α lipoproteinlerin de β+pre-β fraksiyonuna dahil olduğu görülmektedir. Çünkü süpermatantlarda azalan α bandına karşılık, presipitatlardaki β+pre-β bandının yoğunluğu artmakta, bu da kompleks oluşumunu doğrulamaktadır.

Hayvan serum β pre-β lipoproteinlerinin separasyonlarında da heparin/MnCl<sub>2</sub> presipitasyon metodu kullanılmıştır. At, midilli, laktasyondaki ve laktasyon sonu sığırlarda serum lipoprotein dağılımı preparatif ultrasentrifügasyon ve heparin/MnCl<sub>2</sub> (46 mmol/L) çöktürme tekniğiyle gerçekleştirilmiştir (25). Watson ve ark (29) eşek plazma pre-β lipoproteinlerini (VLDL) ultrasentrifüj ile uzaklaştırıldıktan sonra 90 mmol/L heparin/MnCl<sub>2</sub> ile β lipoproteinleri çöktürmüşlerdir. Barrie ve ark. (4,5) EDTA'lı köpek plazmasında ultrasentrifügasyon/heparin-Mn<sup>+2</sup> (92 mmol/L) presipitasyon metodunu uygulayarak apo B içeren lipoproteinleri presipite etmişlerdir. Bu çalışmalarda şilomikronlar ve/veya VLDL ultrasentrifüj ile serumdan uzaklaştırılıp daha sonra polianyonlarla LDL çöktürüldüğünde kullanılan ayıraç konsantrasyonunu mevcut çalışmanınki ile karşılaştırmak çok doğru olmayacaktır. Buna rağmen yapılan çalışmalarda plazmada 92mmol/L, serumda ise 46 mmol/L heparin-MnCl<sub>2</sub>'ün kullanılması, mevcut çalışmada insan ve diğer hayvan türleri için kullanılan konsantrasyonla uyum içindedir. Çeşitli laboratuvar hayvanları, vahşi hayvanlar ve sığır, koyun, keçi, at ve domuz gibi evcil hayvanların serum β lipoproteinleri 46 mmol/L Mn<sup>+2</sup> ve yaklaşık 1.3

mg/ml (~200 IU) heparin ile çöktürülmüştür (26). Bu bulgular mevcut çalışmayla uyumludur. Mevcut çalışmada sadece sığır için x2 ayıraç konsantrasyonu etkili bulunmuştur. Bu da her iki çalışmada kullanılan heparin solüsyonunun farklılığından kaynaklanabilir. Griffin ve Whitehead (17) broiler piliçlerde heparin/Mg<sup>+2</sup> presipitasyonuna dayalı olarak plazma VLDL'i için turbidimetrik bir ölçüm metodu geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmada heparin/MnCl<sub>2</sub>'ün x0.5 konsantrasyonunun tavuk serum β+pre-β lipoproteinlerini presipite etmede yeterli bulunmuştur. Gerek sığır gerekse tavuktaki bu konsantrasyon farklılıklarının nedeni olarak, insan ve çeşitli hayvan türlerinin serum lipoproteinlerinin % dağılımı arasındaki farklar ve lipoprotein partiküllerinin yüzey yük yoğunluğundaki farklılıklar gösterilebilir. İnsan ve çeşitli hayvan türlerinin serum β+ pre-β lipoproteinlerinin toplam lipoproteinlere oranı insanda ~ %70 iken, sığırdaki ~%44, koyun ve keçide ~%22 ve tavukta ~%33 civarındadır. Buna göre insan serumundaki β pre-β lipoproteinlerin çöktürülmesi için gerekli heparin/MnCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun sığır, koyun, keçi ve tavuktan daha az olması gerekirdi. Oysa böyle bir durum söz konusu değildir. β+pre-β lipoproteinlerin yüzey yüklerindeki farklılıklar ayıraç konsantrasyonundaki farklılıkların açıklanmasında daha muhtemel gözükmektedir. Ayrıca lipoprotein-polianyon kompleksinin teşkilinde lipit/protein oranının önemli bir faktör olduğu tespit edilmiştir (9). Buradan hareketle türler arasında lipoproteinlerin lipit/protein oranlarındaki farklılıklar da rol oynayabilir. Sonuç olarak, insanlarda serum β+pre-β lipoproteinlerinin presipitasyonu için kullanılan heparin/MnCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun sığırdaki aynı amaçla iki katının ve tavukta yarısının kullanılması gerektiği ortaya çıkmıştır. İleride heparin/MnCl<sub>2</sub> presipitasyon sonrası lipoprotein/polianyon kompleksinin daha iyi dissosiasyonu sağlamaya ve daha etkin bir elektroforetik separasyon elde etmeye yönelik çalışmalar yapılabilir.

### Kaynaklar

1. Anison EF. Lipid metabolism. In: Freeman BM, Editor. Physiology biochemistry domestic fowl. Academic-Press London. 1983; 4: 165-173.
2. Bachorik PS, Wood PD, Albers JJ, Steiner P, Dempsey M, Kuba K, Warnick R, Karlsson L. Plasma E high-density lipoprotein cholesterol concentrations determined after removal of other lipoproteins by heparin/manganese precipitation or by ultracentrifugation. Clin Chem 1976; 22(11): 1828-1834.
3. Bahler RC, Oppl JJ, Waggoner DM. Lipoproteins in patients with proved coronary artery disease: qualitative and quantitative changes in agarose gel electrophoretic patterns. Circulation 1980; 62(6): 1212-1220.
4. Barrie J, Nash AS, Watson TDG. Quantitative analysis of canine plasma lipoproteins. J Small Anim Pract 1993; 34: 226-234.

5. Barrie J, Watson TDG, Stear MJ, Nash, AS. Plasma cholesterol and lipoprotein concentrations in dog : the effects of age, breed, gender, and endocrine disease. *J Small Anim Pract* 1993; 34: 507-512.
6. Bauer JE. Plasma lipids and lipoproteins of fasted ponies. *Am J Vet Res* 1983; 44(3): 379-384.
7. Bauer JE. Diet-induced alterations of lipoprotein metabolism. *JAVMA* 1992; 201(11): 1691-1694.
8. Burstein M, Scholnick HR, Morfin R, Rogers WA, Donovan EF, Kociba GJ. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res* 1970; 11: 583-595.
9. Burstein M, Scholnick HR. Lipoprotein - polyanion - metal interactions. *Adv Lipid Res* 1973; 11, 67: 67-108.
10. Chapman MJ. Animal lipoproteins : chemistry, structure, and comparative aspects. *J Lipid Res* 1980; 21: 789-853.
11. Contois JH, Gilmore RG, Moore RE, Contois L-R, Macer JL, Wu AHB. Quantitative determination of cholesterol in lipoprotein fractions by electrophoresis. *Clin Chim Acta* 1999; 282: 1-14.
12. Demacker PNM, Vos-Janssen H, Hijmans AGM, Laar van't A, Jansen AP. Measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum: comparison of six isolation methods combined with enzymic cholesterol analysis. *Clin Chem* 1980; 26, 13: 1780-1786.
13. Demacker PNM. Accuracy and precipitation efficiency of improved precipitation-methods for quantifying high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1985; 31(10): 1768-1770.
14. Eklund A, Sjöblom L. Improved banding pattern of rat plasma lipoproteins developed by agarose gel electrophoresis at pH 7.0. *Biochim Biophys Acta* 1986; 877: 135-140.
15. Ferreri LF, Gleockler DH. Electrophoretic characterisation of bovine lipoprotein subfractions isolated by agarose gel chromatograph. *J Dairy Sci* 1979; 62: 1577-1582.
16. Griel LC, McCarty RD. Blood serum lipoproteins: a review. *J Dairy Sci* 1969; 52(8): 1233-1243.
17. Griffin HD, Whitehead CC. Plasma lipoprotein concentration as an indicator of fatness in broilers : development and use of a simple assay for plasma very low density lipoproteins. *Br Poult Sci* 1982; 23(4): 307-313.
18. Karcher RE, Nuttall KL. Lipoprotein agarose gel electrophoresis. In: Burtis, CA, Ashwood, ER. Editors. *Tietz textbook of clinical chemistry*. Pennsylvania. WB Saunders Company, 1999; 154-155.
19. Lindahl U, Höök M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Ann Rev Biochem* 1978; 47: 385-417.
20. Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA. Cholesterol determination in high density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 1977; 23(5): 882-884.
21. Muirhead RA, Dodd HEJ. Manganese-heparin precipitation of very low-density lipoprotein: screening for type III hyperlipoproteinaemia. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 289-291.
22. Naito HK. High-density lipoprotein (HDL) cholesterol. In: Kaplan LA., Pesce AJ, Editors. *Clinical chemistry theory, analysis and correlation*. USA. The CV Mosby Company, 1989; 983-991.
23. Naito HK. Lipoprotein electrophoresis. In: Kaplan LA, Pesce AJ., Editors. *Clinical chemistry theory, analysis and correlation*. USA. The CV Mosby Company, 1989; 1195-1207.
24. Sparks DL, Phillips MC. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. *J Lipid Res*, 1992; 33: 123-130.
25. Van Dijk S, Wensing TH. Comparison of the lipoprotein pattern of the horse, the pony and the lactating and non-lactating cow obtained by a combination of an ultracentrifugation and a precipitation technique. *Comp Biochem Physiol* 1989; 94B, 4: 735-738.
26. Vitic J, Stevanoic J. Comparative studies of the serum lipoproteins and lipid in some domestic, laboratory and wild animals. *Comp Biochem Physiol* 1993; 106B, 1: 223-229.
27. Warnick GR, Albers JJ. A comprehensive evaluation of heparin-manganese procedure for estimating high density lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res* 1978; 19: 65-76.
28. Warnick GR, Benderson JM, Albers JJ. Dextran sulfate-Mg<sup>2+</sup> precipitation procedure for quantitation of high-density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982; 28(6): 1379-1388.
29. Watson TD, G, Packard J, Shepherd J, Fowler JN. An investigation of the relationships between body condition and plasma lipid and lipoprotein concentrations in 24 donkeys. *Vet Rec* 1990; 17: 498-500.