

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

99124

ÇEŞİTLİ EVCİL HAYVAN TÜRLERİNİN SERUM
LİPOPROTEİNLERİNİN FARKLI
PRESİPİTASYON METOTLARI İLE
SEPARASYONLARI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DOKTORA TEZİ

TÜLAY İLERİ

F.Ü. VETERİNER FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. TAYFUN GÜLDÜR



ELAZIĞ-2000

99124

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER.....	II
1. ÖNSÖZ.....	VI
2. GİRİŞ.....	1
2.1. LİPOPROTEİNLER VE METABOLİZMALARI.....	1
2.1.1. Lipoproteinlerin Genel Yapıları.....	1
2.1.2. Lipoproteinlerin Sınıflandırılması.....	1
2.1.3. Apolipoproteinler ve Metabolik Rollerini.....	1
2.1.4. Hayvan Lipoproteinleri.....	3
2.1.4.1. Ruminant Lipoproteinleri.....	3
2.1.4.2. Köpek Lipoproteinleri.....	7
2.1.4.3. Kedi Lipoproteinleri.....	7
2.1.4.4. At Lipoproteinleri.....	9
2.1.4.5. Tavuk Lipoproteinleri.....	12
2.1.5. Lipoproteinlerin Metabolizmaları.....	14
2.1.5.1. Ekzojen Lipidlerden Kaynaklanan Lipoproteinler.....	14
2.1.5.2. Endojen Lipidlerden Kaynaklanan Lipoproteinler.....	19
2.1.6. Tavuk Lipoproteinlerinin Metabolizması.....	21
2.2. LİPOPROTEİNLERİN SEPARASYON TEKNİKLERİ.....	23
2.2.1. Presipitasyon Tekniği ve Klinik Önemi.....	23
2.2.2. Polianyon-Lipoprotein Etkileşimi.....	25
2.3. AMAÇ.....	31
3. MATERYAL VE METOT.....	34
3.1. MATERYAL.....	34
3.1.1. Kan Örneklerinin Alınması.....	34
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	34
3.1.2.1. AgaroZ Jel Elektroferezinde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	34
3.1.2.2. Lipoprotein Presipitasyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	34
3.1.2.3. SDS-PAG Elektroferezinde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	34

3.1.3. Kullanılan Teçhizatlar.....	35
3.2. METOT.....	35
3.2.1. Lipoprotein Presipitasyon Metotları.....	35
3.2.1.1. Heparin/MnCl ₂ ile Serum $\beta + pre-\beta$ Lipoproteinlerinin Presipitasyonu.....	35
3.2.1.2. Dekstran Sülfat/MnCl ₂ ile Serum $\beta + pre-\beta$ Lipoproteinlerinin Presipitasyonu.....	36
3.2.1.3. Fosfotungstik asit/MgCl ₂ ile Serum $\beta + pre-\beta$ Lipoproteinlerinin Presipitasyonu.....	37
3.2.1.4. Polietilen Glikol İle Serum $\beta + pre-\beta$ Lipoproteinlerinin Presipitasyonu.....	37
3.2.2. Agaroz Jel Elektroforez Metodu.....	38
3.2.3. Protein Tayini.....	41
3.2.4. SDS-PAG Elektroforez Metodu.....	42
4. BULGULAR.....	49
4.1. DENEMELER.....	49
4.1.1. Vertikal Slab Jel Düzeneginin Agaroz Jel Elektroforez İçin Adaptasyonu.....	49
4.1.2. Optimum Agaroz Jel Elektroforez Şartlarının Belirlenmesi.....	50
4.1.3. Serum $\beta + pre-\beta$ Lipoproteinlerinin Presipitasyonla Separasyon Denemeleri.....	50
4.2. SERUM LİPOPROTEİNLERİNİN PRESİPİTASYON METOTLARI İLE SEPARASYONLARININ AGAROZ JEL ELEKTROFOREZ SONUÇLARI.....	51
4.2.1. Heparin/MnCl ₂ Presipitasyonu İle Serum Lipoproteinlerinin Separasyonları.....	51
4.2.1.1. İnsan Lipoproteinleri.....	51
4.2.1.2. Sığır Lipoproteinleri.....	52
4.2.1.3. Koyun Lipoproteinleri.....	52
4.2.1.4. Keçi Lipoproteinleri.....	52
4.2.1.5. Kedi Lipoproteinleri.....	52
4.2.1.6. Köpek Lipoproteinleri.....	53
4.2.1.7. At Lipoproteinleri.....	53
4.2.1.8. Tavuk lipoproteinleri.....	53

4.2.2. Dekstran Sülfat/MnCl₂ Presipitasyonu ile Serum

Lipoproteinlerinin Separasyonu.....	53
4.2.2.1. <i>İnsan Lipoproteinleri</i>	53
4.2.2.2. <i>Sığır Lipoproteinleri</i>	54
4.2.2.3. <i>Koyun Lipoproteinleri</i>	54
4.2.2.4. <i>Keçi Lipoproteinleri</i>	54
4.2.2.5. <i>Kedi Lipoproteinleri</i>	54
4.2.2.6. <i>Köpek Lipoproteinleri</i>	55
4.2.2.7. <i>At Lipoproteinleri</i>	55
4.2.2.8. <i>Tavuk Lipoproteinleri</i>	55

4.2.3. Sodyum Fosfotungstat/MgCl₂ Presipitasyonu ile Serum

Lipoproteinlerinin Separasyonu.....	56
4.2.3.1. <i>İnsan Lipoproteinleri</i>	56
4.2.3.2. <i>Sığır Lipoproteinleri</i>	56
4.2.3.3. <i>Koyun Lipoproteinleri</i>	56
4.2.3.4. <i>Keçi Lipoproteinleri</i>	56
4.2.3.5. <i>Kedi Lipoproteinleri</i>	57
4.2.3.6. <i>Köpek Lipoproteinleri</i>	57
4.2.3.7. <i>At Lipoproteinleri</i>	57
4.2.3.8. <i>Tavuk Lipoproteinleri</i>	57

4.2.4. Polietilen Glikol Presipitasyonu İle Serum Lipoproteinlerinin

Separasyonu.....	58
4.2.4.1. <i>İnsan Lipoproteinleri</i>	58
4.2.4.2. <i>Sığır Lipoproteinleri</i>	58
4.2.4.3. <i>Koyun Lipoproteinleri</i>	58
4.2.4.4. <i>Keçi Lipoproteinleri</i>	58
4.2.4.5. <i>Kedi Lipoproteinleri</i>	59
4.2.4.6. <i>Köpek Lipoproteinleri</i>	59
4.2.4.7. <i>At Lipoproteinleri</i>	59
4.2.4.8. <i>Tavuk Lipoproteinleri</i>	59

4.3. PRESİPİTASYON AYIRAÇLARI İLE PRESİPİTE EDİLEN İNSAN

VE ÇEŞİTLİ HAYVAN TÜRLERİNE AİT SERUM β + PRE- β APOLİPOPROTEİNLERİNİN SDS-PAGE ANALİZLERİ.....	60
--	----

5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	99
---------------------------	----

6.ÖZET	126
7.SUMMARY	128
8.KAYNAKLAR	130
9.ÖZGEÇMİŞ	138
10.TEŞEKKÜR	139



1. ÖN SÖZ

İnsanlarda lipoproteinlerin koroner arter hastalığı riski ve çeşitli dislipoproteinemiler ile olan bağlantıları nedeniyle, lipoprotein fraksiyonlarının ve lipit kompozisyonlarının tayinleri önem arz etmektedir. En sık kullanılan lipoprotein separasyon yöntemlerinden biri de presipitasyon yöntemidir. Bu amaçla heparin, fosfotungstik asit ve dekstran sülfat gibi polianyonlar divalent katyonlarla beraber ve ayrıca polietilen glikol gibi nötral polimerler kullanılmaktadır (37).

Presipitasyon metotlarının kısa sürede uygulanması ve basit olmasından dolayı daha çok HDL kolesterol ölçümünde kullanılmaktadır. Polianyon presipitasyon metodu plazmadan sadece apo B içeren lipoproteinleri [β (LDL) ve pre- β (VLDL)] presipite etmek için kullanılmaktadır. HDL süpernatantta kalır ve süpernatantın kolesterol içeriği total HDL konsantrasyonunun belirlenmesine olanak tanır (63).

Hayvan türlerinde de çeşitli dislipoproteinemialar bildirilmiştir. Sığırlarda görülen karaciğer yağlanması (hepatic lipidosis) (61, 34), anaplazmosis (14), theleria (96) ve ketozis (29, 35) gibi hastalıklarda lipoprotein profilinde değişiklikler gözlenmiştir. Paraneoplastik karaciğer hastalıklarında ve tıkanma sarılığında lipit metabolizmasındaki bozukluklardan bahsedilmiştir (40,75). Atlarda kolik ve çimen hastalığında (62) ve laminitis'de (70) serum lipit ve lipoprotein konsantrasyonlarındaki değişimler bildirilmiştir. Karnivorlarda pankreatitis, diabetes mellitus, renal hastalıklar, hipotiroidizm, kolestazis ve laishmania gibi paraziter enfestasyonlarda da hiperlipidemialar tespit edilmiştir (7, 9,11, 66, 71,72).

Polianyon presipitasyon tekniklerinin insan serum lipit dislipoproteinemilerinin tespitinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, hayvan serum lipit dislipoproteinemilerinin belirlenmesinde aynı metotların kullanılmadan önce adapte edilmesi gerektiği bilinmektedir (11). Fakat insan serum lipoproteinlerinin separasyonunda kullanılan presipitasyon metotlarının hayvanlara adapte edilmesine dair çok az çalışma mevcuttur (37).

Mevcut çalışmada insanlar için en sık kullanılan heparin, dekstran sülfat, sodyum fosfotungstat, polietilen glikol presipitasyon metotları, sığır, koyun, keçi, kedi, köpek, at ve tavuk gibi çeşitli hayvan türlerinin serum β + pre- β lipoproteinlerinin presipitasyonu için adapte edildi. Presipitasyonun etkinliğine presipitat ve süpernatantlardaki lipoproteinler agaroz jel elektroforezi ile tespit edilerek karar verildi. Son olarak da β +

pre- β lipoproteinlerin tam olarak presipite olduğu presipitatların apolipoprotein kompozisyonu SDS-PAGE ile gösterildi.

Hayvan türleri için şimdiye kadar rastlanılmayan karşılaştırmalı bir presipitasyon/elektroforez separasyon yöntemi uygulanarak ve türler arasında en etkin presipitasyon ayıraç konsantrasyonu belirlenerek insan ve hayvan serum lipoproteinlerinin karşılaştırmalı bir separasyonu yapıldı.

Kullanılan presipitasyon/elektroforez separasyon yöntemi ultrasantrifügasyona göre daha az ekipman ve uzmanlık gerektirmektedir. Ayrıca bu separasyon yöntemi ultrasantrifügasyona göre daha ucuz, nisbeten daha kolay ve rutin laboratuvarlara kolayca adapte edilebilir bir yöntemdir. Bu nedenle presipitasyon/elektroforez separasyon yöntemi, veteriner hekimliğinde hayvan serumundaki çeşitli lipoprotein sınıflarının izolasyonunda ve lipit kompozisyonlarının ortaya konulmasında, hayvanlarda bildirilen lipit metabolizmasında bozukluklara yol açan hastalıkların teşhis ve prognozunun takibinde kullanılabilir. İnsanlar için kullanılan HDL kolesterol ölçüm metotlarının direkt olarak hayvan serumlarına uygulanmasının doğruluk derecesi tartışmalıdır. Çünkü yapılan çalışmada, insan serum lipoproteinlerini presipite etmek için yeterli olan ayıraç miktarlarının hayvan lipoproteinleri için aynı derecede etkili olmadığı tespit edildi. Böylece hayvanlarda yapılan HDL kolesterol ölçümlerinin apo B içeren lipoproteinlerin (β ve pre- β) tam bir presipitasyonu sağlandıktan sonra yapılması gerektiğinin ortaya konulmasının da gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutması muhtemeldir.

Daha ileri ve detaylı çalışmalarla hayvan türlerinde HDL kolesterolünü belirlemek için presipitasyon yöntemleri otomatize edilebilir ve kliniklerde kullanılmaya adapte edilebilir. Günümüzde otoanalizatörlerde yapılan direkt HDL kolesterol ölçüm yöntemi (enzimatik olarak) kitleri çok pahalıdır ve yine insan serumları için dizayn edilmiştir. Bazı presipitasyon metotlarının da en az direkt HDL kolesterol ölçümü kadar iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (27).

Mevcut çalışma, insanlarda kullanılan presipitasyon metotlarının hayvan serum lipoproteinlerine adaptasyonunun sağlanması açısından önemlidir. Daha ileride hayvan serum lipoproteinlerinin yapısının, kompozisyonunun ve presipitasyon ayıraçları ile etkileşimlerinin daha detaylı olarak ortaya konulmasına katkıda bulunabilecektir.

2.GİRİŞ

2.1. LİPOPROTEİNLER VE METABOLİZMALARI

2.1.1. Lipoproteinlerin Genel Yapıları

Plazma lipoproteinleri, spesifik proteinler (apolipoproteinler) ve lipidler (kolesterol, kolesteril esterleri, fosfolipidler ve triaçilgliseroller) içeren suda çözünür komplekslerdir. Lipoproteinler, aküöz ortamda çözünür hale gelmek için kolesteril esterleri ve triaçilgliserollerden kurulu hidrofobik çekirdek ile bunu çevreleyen proteinler, fosfolipidler ve kolesterolden ibaret kısmen hidrofilik kabuktan oluşan bir yapıya sahiptirler.

Lipoproteinlerin protein kısmı, apolipoprotein veya apoprotein olarak bilinir. Apolipoproteinlerin bazıları, integral apolipoproteinler olup lipoprotein partikülü içine gömülü vaziyettedirler. Diğerleri ise periferde olup bir lipoproteinden diğerine transfer edilebilirler (Şekil 1) (48,60, 74).

2.1.2.Lipoproteinlerin Sınıflandırılması

Boyut, kimyasal kompozisyon ve dansitedeki farklılıklar lipoproteinleri ayırmayı mümkün kılmaktadır (13).

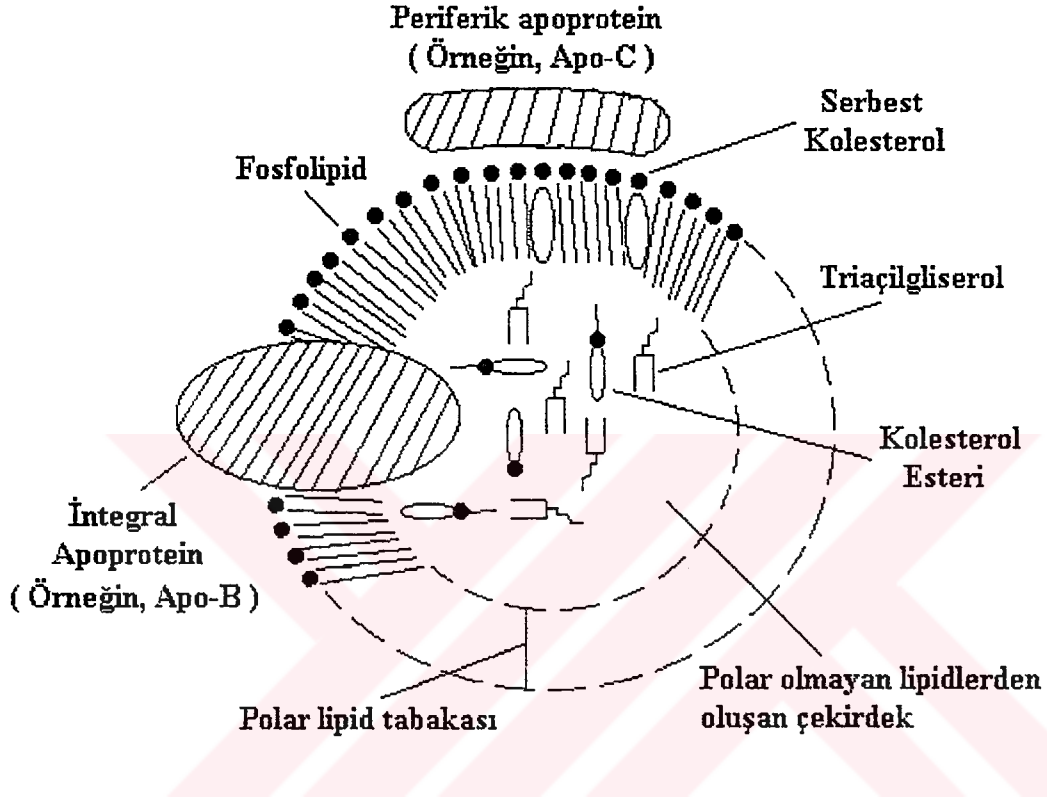
Plazma lipoproteinlerinin çok yaygın olarak kabul edilen sınıflandırılması ultrasantrifügasyon ile yapılanıdır. Flotasyon özelliklerine göre lipoproteinler şilomikronlar, çok düşük dansiteli lipoproteinler (Very Low Density Lipoprotein: VLDL), orta dansiteli lipoproteinler (Intermediate Density Lipoprotein : IDL) düşük dansiteli lipoproteinler (Low Density Lipoprotein: LDL), yüksek dansiteli lipoproteinler (High Density Lipoprotein: HDL) olarak sınıflandırılmaktadır.

Plazma lipoproteinleri değişik destek ortamlarında elektroforetik olarak α , β veya γ globulinler ile göç etmelerine göre, pre- β (VLDL), β (LDL) ve α (HDL) lipoproteinler olarak sınıflandırılabilirler. Şilomikronlar orjinde kalır (60).

2.1.3. Apolipoproteinler ve Metabolik Roller

Her bir lipoproteinde bir yada daha fazla apolipoprotein bulunur. ABC adlandırılmasına göre, HDL'in temel apolipoproteinini A ile gösterilir. LDL'in ana apolipoproteinini aynı zamanda VLDL ve şilomikronlarda da bulunan apolipoprotein

B'dir. Bununla beraber, şilomikronların apo B (B-48)'si LDL veya VLDL'in apo B (B-100)'sinden daha küçüktür. B-48 bağırsaklarda ve B-100 karaciğerde sentezlenir.



Şekil 1. Lipoprotein partikülünün genel yapısı (3)

Apo B-100, 4536 amino asit içeren, bilinen en uzun polipeptid zinciridir. Apo B-48 (B-100'ün %48'i kadar büyüklüktedir) apo B-100 gibi aynı mRNA'dan oluşur. Apo B-48, 2152 amino asit içerir ve prematüre translasyonal bir stop kodon içeren

mRNA'dan sentezlenir. Apo B mRNA'ındaki prematüre stop kodon, 6666 nükleotidde sitozin (C) bazını urasil (U) bazıyla değiştirir. Apo B-100'deki glutamin amino asidini kodlayan kodon CAA'yı UAA'ya dönüştürür. Stop kodon, genomik DNA'da mevcut değildir ve tek bir genden 2 proteinin biyosentezine yol açan mekanizmayla RNA düzeyinde başlatılır (13). Apolipoprotein CI, CII ve CIII, lipoproteinler arasında serbestçe transfer olabilen daha ufak polipeptidlerdir. Apo B'nin yaklaşık %5'i karbohidrat olup, mannoz, galaktoz, fukoz, glukoz, glukozamin ve sialik asidi içerir. Böylelikle bazı lipoproteinler (Apo E, C ve B) aynı zamanda glikoproteinlerdir. Plazma lipoproteinlerinde bundan başka birkaç apolipoprotein daha bulunmuştur. Bunlardan bir tanesi VLDL ve HDL'den izole edilen arginin'den zengin apolipoprotein E olup %10 kadar arginin içerir ve bu normal kişilerin total VLDL apolipoproteinlerinin %5-10'unu oluşturursa da, tip III hiperlipoproteinemialı hastaların geniş β -VLDL'lerinde çok miktarda bulunur.

Apolipoproteinlerin başlıca metabolik fonksiyonları :

1) Enzim kofaktörüdürler. Örneğin; C-II, lipoprotein lipazın (LPL); A-I, lesitin kolesterol açiltransferaz'ın (LCAT) kofaktörüdür.

2) Lipid transfer proteinleri olarak rol oynayabilirler. Örneğin HDL'deki apo D [kolesterol ester transfer proteini (CETP)] HDL'in kolesterol esterlerinin şilomikron ve LDL tarafından alınıp karaciğere taşınmasında rol oynar.

3) Dokularda, lipoprotein reseptörleri ile karşılıklı etkileşim için ligandlar olarak görev alırlar. Örneğin, LDL reseptörü için apo B-100, apo E ; remnant reseptörleri için apo E ve HDL reseptörü için apo A-I (60). Başlıca apolipoproteinler, sentez yerleri ve buldukları lipoprotein partikülleri tablo 1 de, lipoprotein sınıflarının kompozisyonları, dansite aralıkları ve elektroforetik mobiliteleri ise tablo 2'de özetlenmiştir.

2.1.4. Hayvan Lipoproteinleri

2.1.4.1. Ruminant Lipoproteinleri

Ruminant lipoproteinleri hakkında mevcut bilgiler çok azdır. Leat ve Northrop (54), Koyun, keçi ve geyiklerde temel lipoprotein sınıfının HDL olduğunu (totalin %80) tespit ettiler. Geyik serumunun analitik ultrasantrifugal analizinde küçük miktarda VLDL'in mevcudiyeti ve LDL'in (66mg/100ml) 3 katı daha fazla miktarda HDL'in (207 mg/100ml) varlığı da bildirilmiştir (19). Vitic ve ark.'larının (84) 1993'de bazı evcil hayvanların serum lipit ve lipoproteinlerine dair çalışmasında koyun, keçi ve sığır

Tablo 1. Apolipoproteinlerin Buldukları Plazma Lipoproteinleri ve Fonksiyonları

Apoprotein	Moleküler Ağırlık	Temel Lipoproteini	Minör Lipoproteini	Sentez Yeri	Fonksiyonu
AI	~28.300	HDL	Şilomikron	Karaciğer	LCAT aktivatörü, Ters kolesterol transportu, HDL reseptör tanıma
AII	~17.400*	HDL	Şilomikron	Karaciğer	LCAT inhibitörü, Fosfolipid bağlar.
B-100	550.000	VLDL,IDL,I,DL,Lp(a)		Karaciğer	LDL reseptörleri için ligand.
B-48	260.000	Şilomikron, Şilomikron artıkları		Bağırsak	Sekresyon
CI	7.600	VLDL,Şilomikron	HDL	Bağırsak,karaciğer	LCAT aktivatörü? Lipoproteinlerin hepatik alımını İnhibe eder.
CII	~9.100	VLDL,Şilomikron	HDL	Bağırsak,karaciğer	LPL aktivatörü
CIII	~8.800	VLDL,Şilomikron	HDL	Bağırsak,karaciğer	LPL inhibitörü
D(AIII)	~32.500	HDL, VLDL			Muhtemelen CETP'e benzer.
E	~34.000	Şilomikron, Şilomikron artıkları, VLDL,IDL,HDL		Bağırsak,karaciğer, beyin,makrofajlar, diğer periferel hücreler	LDL ve remnant reseptör tanıma
AIV	~46.000	Şilomikron VLDL,HDL			
Apo(a)	280.000-800.000	Lp(a)		Karaciğer	Bilinmiyor. Bilinmiyor.

* Dimerik form

LCAT : Lesitin-kolesterol açiltransferaz

CETP : Kolesterol ester transfer protein (13, 40, 48, 60).

Tablo 2. İnsan Lipoprotein Sınıfları ve Bazı Özellikleri

Lipoprotein	Kaynağı	Dansite(g/ml)	Elektroforetik Mobilite	% Kompozisyon					
				TG	KE	SK	PR	FL	SYA
Şilomikron	Bağırsak	d<0.95	Orijin	88	3	1	1-2	8	-
VLDL	Karaciğer ve bağırsak	0.95-1.006	Pre-β	56	15	8	7-10	20	1
IDL	VLDL ve Şilomikron	1.006-1.019	β	29	34	9	11	26	1
LDL	VLDL	1.019-1.063	β	13	48	10	21	28	1
HDL2	Karaciğer ve bağırsak, VLDL?	1.063-1.125	α	16	31	10	33	43	-
HDL3	Şilomikron?	1.125-1.210	α	13	29	6	57	46	6

TG :Triaçilgliserol, **KE**: Kolesterol Esteri, **SK**: Serbest Kolesterol, **PR**: Protein, **FL**: Fosfolipid, **SYA**: Serbest Yağ Asidi (40, 51, 60).

lipoproteinlerinin lipit kompozisyonları ve kağıt elektroforezi ile dağılımları değerlendirilmiştir. Her 3 türde de HDL (α) fraksiyonunun dominant olduğu bildirilmiştir (84).

Bununla birlikte sığırlarda predominant lipit taşıyan moleküllerin (HDL) yapısı iyi bilinmektedir. Sığır serumunun ultrasantrifugal çalışmalarında, insanlardan tamamen farklı olan HDL'in flotasyon özellikleri tespit edilmiştir. $d < 1.21 \text{ g/ml}$ 'lik total lipoproteinlerin yaklaşık %80'ini (ağırlık olarak) oluşturan bu makromoleküller $1.063-1.125 \text{ g/ml}$ dansite aralığında bulunmaktadır. Bu nedenle insandaki HDL2 olarak gösterilen fraksiyona eşdeğerdir. HDL3 ($d < 1.063 \text{ g/ml}$) de az miktarlarda mevcuttur. Sığır HDL'i elektroforezde tek bir bant olarak görülür. Sedimentasyon çalışmalarıyla sığır HDL'inin ortalama moleküler ağırlığının insan HDL2'sine çok benzer olarak 376.000 Da olduğu hesaplanmıştır.

Sığır HDL'inin kimyasal kompozisyonu oldukça değişkendir. Özellikle protein (%28.4-43.5), fosfolipid (%18.6-40.8) ve triaçilgliserol (%0.1-19.9) oranlarında bu değişkenlik söz konusudur. Sadece kolesteril ester içeriği kısmi olarak sabittir (%25.4-31.1). Sığır serumundaki 1.063 g/ml 'den daha az dansiteli lipoproteinler yapı ve dağılımda oldukça komplekstir. Stead ve ark. (79) presipitasyon, ultrasantrifügasyon ve elektroforetik prosedürleri VLDL fraksiyonlarını ($d > 1.019-1.06$) separe etmede kullanmışlardır. IDL içeren ve sadece küçük bir fraksiyonu temsil eden VLDL, diğer memelilerdeki gibi triaçilgliserolden zengindir; fakat ilaveten fazlaca bir fosfolipid içeriği sergiler. Diğer yandan VLDL kolesteril esterinden fakirdir. Sığır LDL1 alt fraksiyonu özellikle fosfolipidden zengindir (%41.2) ve bu nedenle benzer dansite aralığındaki insan fraksiyonuna tam olarak benzemez (LDL1; $d 1.030-1.040 \text{ g/ml}$). Bununla birlikte, insan ve sığır LDL'leri benzer protein ve kolesteril ester içeriğine sahiptir. Stead ve Welch (79) tarafından karakterize edilen LDL2, daha az fosfolipid oranıyla LDL1'den farklıdır. LDL2'nin protein içeriği $d 1.060-1.21 \text{ g/ml}$ 'lik HDL fraksiyonuna eşittir. LDL2 fraksiyonunun apo B içeren bir lipoprotein mi, yoksa $1.04-1.06 \text{ g/ml}$ dansite aralığında izole edilen HDL1'e mi karşılık geldiği henüz açıklanamamıştır.

Sığır VLDL, LDL, LDL1, LDL2 ve HDL'inin lipit esterlerinin yağ asidi kompozisyonu, ruminant sindirim fizyolojisinin az çok bir yansımasıdır. Bu nedenle, LDL1, LDL2 ve HDL'in kolesteril esterlerinin dışındaki sığır lipitleri, muhtemelen rumende oluşan hidrojenizasyondan ötürü insandakinden farklı olarak doymuş yağ asitlerinden zengindir. LDL1, LDL2 ve HDL fraksiyonları linoleat ile 18:2 ve 18:3 yağ

asitlerini içerirler. İlaveten fitanik asit, LDL1, LDL2 ve HDL'in triaçilgliserol ve fosfolipidlerinde mevcuttur (19).

Sığır lipoprotein sınıflarının kompozisyonları tablo 3'de özetlenmiştir (19).

2.1.4.2. Köpek Lipoproteinleri

Köpek lipoproteinleri, VLDL, LDL, HDL1 ve HDL2 olmak üzere 4 temel sınıfa ayrılmaktadır. Bunlardan VLDL, LDL ve HDL2 insandaki lipoprotein fraksiyonlarına benzer bulunmuştur. <1.006 g/ml dansiteli fraksiyon (köpek VLDL'i) 26-90 nm çapında triaçilgliserolden zengin partiküller içerir. Bu fraksiyonun elektroforezde pre- β mobiliteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, VLDL köpek serumunda nadiren görülür. Genellikle β lipoproteinlerle göç eder ve β band içinde saklıdır. Bazı laboratuvarlar aslında α_2 bandı olan bir pre- β bandı bildirmektedirler. Bu hatanın sebebi insan serum lipoprotein elektroforezinin sadece tek bir α bandıyla sonuçlanmasıdır. Oysa köpek serumu, α_2 ve α_1 diye 2 alfa bandı sergilemektedir (11, 72).

İnsan serumu, elektroforezde β , pre- β ve α bandlarını içermektedir ve β lipoproteinler daha fazladır. Köpek serumunda ise genellikle β , α_2 ve α_1 bantları belirlenmiştir ve α lipoproteinlerin üstünlüğü söz konusudur. Köpeklerde α_2 sınıfı insan LDL'indeki kolesterole yakın kolesterol içerir. α_1 lipoproteinler sağlıklı köpeklerde kolesterolün çoğunu içerir ve onun temel taşıyıcısıdır. İnsan türlerinde LDL bu görevi üstlenmektedir. α_1 lipoproteinler kolesterolden zenginleştikçe α_2 lipoproteinlere dönüşürler. Bu nedenle α_1 lipoproteinlerin kolesterolce zenginliği α_2 artışlarıyla sonuçlanmaktadır. Köpek serum lipoproteinlerinin lipit kompozisyonu tablo 4'de sunulmuştur (19).

2.1.4.3. Kedi lipoproteinleri

Kedi lipoproteinleri dansite gradient ultrasentrifügasyon yöntemiyle 4 farklı sınıfa ayrılmıştır : VLDL + IDL, LDL, HDL2, ve HDL3. İnsan plazmasına benzer olarak agaroz jel elektroforezde 3 yaygın sınıf görülmektedir. Bununla birlikte, insanlardan farklı olarak kedilerde LDL den 5-6 kat daha fazla HDL mevcuttur. 1.019 g/ml dansitede izole edilen VLDL + IDL fraksiyonununun kedi VLDL'i olduğu agaroz jelde pre- β mobiliteye sahip olmasıyla desteklenmiştir. Bu partikül insan VLDL'inkinden daha fazla triaçilgliserol içerir. 1.019-1.063 g/ml dansite aralığında, insan LDL'ine

Tablo 3. Sığır Serum Lipoproteinlerinin Lipid Kompozisyonları (% ağırlık)

	VLDL	LDL	HDL
Kolesterol ester	3.7	41.2	25.4
Serbest kolesterol	4.9	11.2	4.1
Triçilgliserol	60.2	6.8	19.9
Fosfolipid	25.1	21.5	18.6
Protein	6.0	19.4	32

* Fraksiyonlar ultrantrifügasyonla izole edilmiştir (19).

benzer partiküller bulunmuştur. Bu lipoproteinlerin insan LDL'inden daha çok negatif yükle yüklü ve ve biraz daha küçük olmasına rağmen, agaroz jelde β pozisyonda göç ettiği gözlenmiştir. 1.063-1.21 g/ml'lik hidratize dansiteye sahip kedi HDL fraksiyonları, insan HDL fraksiyonları gibi benzer boyut ve elektroforetik mobilitelere sahiptirler. Bu nedenle elektroforezde insan ve kedi terminolojilerinin uyuştuğu ve insan laboratuvarlarından elde edilen sonuçların direkt olarak kedi lipoproteinlerine de uygulanabileceği ileri sürülmüştür (11). Kedilerdeki LDL düzeyleri köpeklerden daha fazladır. VLDL düşük konsantrasyonlarda mevcuttur ve köpeklerde olduğu gibi HDL predominanttır (46).

2.1.4.4. At Lipoproteinleri

At, koyun, keçi ve öküz gibi otçulların plazmasında predominant kolesterol taşıyan lipoprotein HDL'dir. Aksine insanlarda plazma kolesterolünün %70'den fazlası LDL ile sirküle olur. Farklılıkların sebebi kesin olarak belli değildir. Fakat bu türlerde kolesterol ester transfer proteinin (CETP'nin) yokluğu önemsenecek bir durumdur. Bu eksiklik at ve insanlardaki lipoprotein patofizyolojisinin ayrılıklarını gözlemlemeye öncülük edebilir (76).

Genellikle at serumunda elektroforezde β , pre- β ve α bantları tespit edilebilmektedir. α lipoproteinlerin diğerlerine oranla fazla miktarda olduğu gözlenmiştir (12).

At lipoproteinlerinin bir diğer elektroforetik sınıflandırmaya göre; şilomikronlar (sadece otlayan atlarda), β lipoprotein ve 3α lipoprotein fraksiyonlarını içerdiği belirlenmiştir. α lipoprotein fraksiyonlarının 2'si $\alpha 1b$ globulinlerle göç ederken, diğeri $\alpha 2b$ globulinlerle göç etmektedir. 2 $\alpha 1b$ lipoprotein fraksiyonu, yavaş ve hızlı diye isimlendirilmektedir. Hızlı band, yavaş bandın anodal bölgesinde bir çıkıntı vererek göç etmektedir.

Atların lipoprotein kompozisyonları yazarlar tarafından az çok farklılıklarla tanımlanmıştır. Bazı araştırmacılar VLDL'in olmadığını bildirirken, bazıları normal atlarda şilomikronları belirlemişlerdir (8).

Atlar total lipitlerinin %76 gibi büyük bir oranını HDL fraksiyonunda taşıdıkları için çoğu hayvanlara büyük oranda benzerlik göstermektedirler. Diğer yandan insanlarda HDL fraksiyonu lipitlerin sadece %35'ini taşır (8). At lipoproteinlerinin lipit kompozisyonları tablo 5'de sunulmuştur.

Tablo 4 . Köpek Serum Lipoproteinlerinin Lipid Kompozisyonları (% ağırlık)

	VLDL	LDL	HDL ₁	HDL
Kolesterol ester	2	11	36.5	15
Serbest kolesterol	6	11	7.7	6
Triaçilgliserol	68	30	1.9	2
Fosfolipid	10	20	34.6	42
Protein	14	28	19.2	35

* Fraksiyonlar ultrasantrifügasyonla izole edilmiştir (19).

Tablo 5. At Serum Lipoproteinlerinin Lipid Kompozisyonları (% Ağırlık)

	<u>VLDL</u>	<u>LDL</u>	<u>HDL</u>
Kolesterol Esteri	16.3 ± 2.6	41.8 ± 4.3	20.7 ± 3.4
Triaçilgliserol	53.8 ± 4.5	6.1 ± 2.3	8.8 ± 3.5
Serbest Kolesterol	belirlenemedi	5.2 ± 1.6	0.8 ± 0.4
Fosfolipid	14.3 ± 3.3	23.8 ± 3.5	25.8 ± 3.9
Protein	16.3 ± 3.2	29.9 ± 3.5	42.9 ± 4.2

* Agaroz jel filtrasyon kromatografisi ile izole lipoprotein sınıfları analiz edildi (19).

2.1.4.5. Tavuk Lipoproteinleri

Analitik ultrasantrifügasyon metodu ile yumurtlayan tavukların serumundan VLDL ve HDL olarak 2 lipoprotein sınıfı izole edilmiştir. Horoz ve piliçlerde, VLDL'in LPL tarafından kan dolaşımından çabucak uzaklaştırılmasından dolayı bu lipoprotein fraksiyonu muhtemelen mevcut değildir. Yumurtlamanın başlamasıyla VLDL'deki yoğun artış artan östrojen düzeyleriyle ilişkili olarak karaciğerdeki sentezin atmasının sonucudur (41). Ergin tek ibikli beyaz Leghorn tavuklar ve horozlarda plazma lipoproteinlerinin dağılımı çalışılmıştır. VLDL ve HDL'in düzeyleri horozlar ve yumurtlamayan tavuklarda oldukça benzer bulunmuştur (VLDL horozda 54 mg/100ml, yumurtlamayan tavukta 71 mg/100ml ve HDL, horozda 370 mg/100ml, yumurtlamayan tavukta 361 mg/100ml'dir.). Tersine yumurtlayan tavuklarda VLDL artmakta HDL ise azalmaktadır (sırasıyla, 1401 ve 151 mg/ml). LDL konsantrasyonu ise daha az değişmektedir. LDL, yumurtlayan ve yumurtlamayan kanatlılarda benzer oranlarda mevcuttur (sırasıyla, 152 ve 183 mg/100ml) ve horozda daha düşüktür. Ergin horozlarda VLDL'in mevcut olmadığı bildirilmiştir (19) (Tablo 6).

Ergin olmayan tavukların düşük VLDL düzeylerinin yumurta üretiminin başlamasıyla 1000-2000 mg/ml serum düzeyine ulaştığı doğrulanmıştır (19). Benzer VLDL düzeylerine yüksek oranda östrojen (örneğin dietilstilbestrol) verilen tavuklarda da rastlanılmıştır. Yumurtlayan tavukların VLDL'i küçük partiküllerden ibarettir. Ortalama 340 Å çapında, yüksek flotasyon oranına sahiplerdir. Böylesine anormal bir dağılım sadece yumurtlayan tavuklardaki VLDL'de görülmez, bu durum LDL için de geçerlidir. Bu nedenle, kanatlılardaki düşük dansiteli lipoproteinler ekseriyetle yüksek flotasyon oranına sahiplerdir. Bu nedenle memelilerin ve insanların LDL'inden ziyade IDL olarak tanımlanabilirler.

Sülün, ördek, tavuk, kaz ve hindi serumlarının agaroz jel elektroforezlerinden elde edilen semikantitatif bilgilere göre; genç ve ergin erkek kanatlılarda ve yumurtlamayan dişilerde HDL dominantken, orta düzeyli LDL ile az miktarlarda VLDL (hatta eser miktarda) tespit edilmiştir. Yumurtlayan dişilerde ise yüksek konsantrasyonlarda VLDL (>1000mg/100ml serum) ile LDL miktarına yakın yada benzer düzeylerde oldukça azalan HDL belirlenmiştir. Yumurta sarısından izole edilen VLDL serumdan izole edilen VLDL'e identiktir. Ultrasantrifugal çalışmalar göstermiştir ki tavuk serumundaki VLDL yaklaşık Sf 40'lık flotasyon oranına, LDL Sf 13'lük bir orana sahiptir (19).

Agoroz jel elektroforez esnasında, HDL'in albüminin sonunda, VLDL'in orjinden az bir uzaklıkta ve LDL'in , VLDL'den hafifçe ilerde göç ettiği gösterilmiştir. Serum

Tablo 6 . Tavuk Serum Lipoproteinlerinin Lipid Kompozisyonları (% ağırlık)

	Civciv		Horoz		Yumurtlamayan Tavuk		Yumurtlayan Tavuk	
	VLDL	LDL HDL	VLDL	LDL HDL	VLDL	LDL HDL	VLDL	LDL HDL
Kolesteril ester	41.3	24.3 15.0	9.3	20.5 16.0	11.4	21.0 *	5.1	9.3 7.9
Serbest kolesterol		2.9		5.0				1.4
Triaçilgiserol	28.6	23.3 2.0	57.4	30.1 6.4	55.7	19.9 *	56.5	41.3 8.2
Fosfolipid	19.1	23.0 24.0	18.5	31.3 28.7	18.6	40.3 *	25.8	31.3 17.6
Protein	10.9	29.3 56.1	14.8	18.1 43.9	14.3	18.8 *	12.7	18.0 64.0

* Yumurtlamayan tavuk HDL lipoprotein kompozisyonu bulunamadı (19).

[İçindeki değerler: Total kolesterolü ifade etmektedir.

VLDL'i, yumurta sarısı VLDL'i ve serum LDL'deki apolipoproteinlerin amino asit kompozisyonu benzer bulunmuştur (41).

Kanatlılardaki temel lipoprotein sınıflarına ilaveten bir lipofosfoprotein kompleksi yumurtlayan dişilerde mevcuttur. Bu kompleks tavuk plazmasından izole edilmiştir ve vitellogenin olarak adlandırılmaktadır. Fosvitin ve lipovitellin olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu fraksiyon da β lipoproteinlerin (LDL) değişken porsiyonlarını içermektedir. %15-20 lipid içerdiği için hidratize dansitesi 1.21g/ml'nin üzerindedir. 1.006 g/ml'den daha az dansiteli tüm tavuk lipoproteinleri cinsiyet ve yumurtlama durumuna bağlı olmaksızın triaçilgliserolden zengindirler. Tüm kuş türlerinin HDL'i %43,9-64 arasında yüksek protein içeriğiyle ve LDL'den daha düşük lipid oranıyla karakterizedir (19) (Tablo 6).

Topluca hayvan türlerinin ultrasentrifugal olarak izole edilen lipoprotein fraksiyonlarının serumdaki oranları tablo 7'de gösterilmiştir. İnsandan farklı olarak belirtilen evcil hayvan türlerinde HDL fraksiyonu en büyük kısmı teşkil etmektedir. Oysa insanda en fazla bulunan fraksiyon LDL'dir. İnsan ve diğer hayvan türlerinin serum lipit konsantrasyonlarına bakıldığında (47) gerek total kolesterol gerekse triaçilgliserol konsantrasyonlarının hayvan türlerinde insana göre oldukça düşük olduğu görülmektedir (Tablo 8).

Elektroforetik olarak insan ve diğer hayvan türlerindeki serum lipoproteinlerinin dağılımlarının dansitometrik görünümleri ise şekil 2 ve şekil 3'de verilmiştir.

2.1.5. Lipoproteinlerin Metabolizmaları

2.1.5.1. Ekzojen Lipidlerden Kaynaklanan Lipoproteinler

Ekzojen lipidlerden köken alan, sindirim kanalında şekillenen başlıca lipoprotein partikülleri, diğer lipoproteinlere göre daha büyük, hafif ($d < 0.95$) ve triaçilgliserolden zengin olan **şilomikronlar**'dır. Sadece bağırsağı direne eden lenf sisteminde oluşan şilus içinde bulunurlar. Bunlar besinlerle alınan lipitlerin tümünün çeşitli dokulara kullanım ve depolama amacıyla taşınmasından sorumludurlar.

Şilomikronlar enterositler tarafından sentezlenirler. Apolipoprotein B, granüllü endoplazmik retikulumdaki ribozomlarda sentez edilerek, triaçilgliserollerin temel sentez yeri olan düz endoplazmik retikulumda sentezlenmiş olan şilomikronlara katılır. Golgi aygıtında lipoproteinlere karbohidrat artıkları eklenir. Şilomikronlar salgılayıcı vakuolün hücre zarı ile birleşmesi yoluyla (tersine pinositoz) bağırsak hücrelerinden

Tablo 7. İnsan ve Çeşitli Hayvan Türlerinin Serum Lipoprotein Dağılımları (% gr)

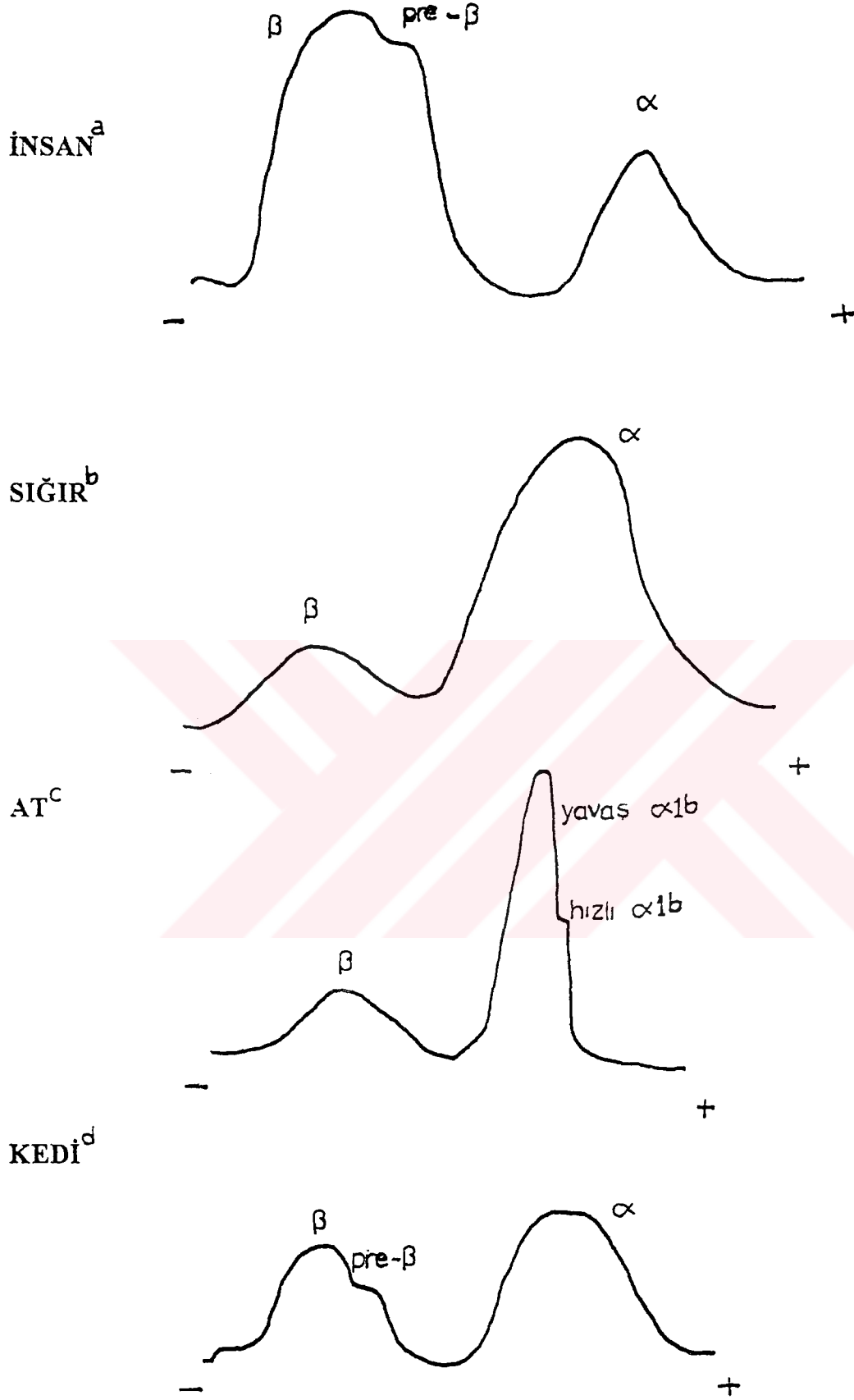
Türler	Şilomikron	VLDL	LDL	HDLI	HDL
İnsan***	0-2	10-12	50-60	-	28-33
Sığır* (Laktasyondaki)	1.5	4.7	38.2	55.6	-
Sığır* (Laktasyon sonu)	2.5	7.2	32.7	57.6	-
Koyun**	-	-	21.9	-	78.1
Keçi**	-	-	21.3	-	78.7
Kedi***	0-1	2-16	23-33	-	52-70
Köpek***	0-1	çok az	16-24	4-22	57-77
At*	3.3	10.6	25.7	-	60.4
Tavuk****	-	11.1	22.3	-	66.6

(* 81, ** 54, *** 11, **** 19. literatürler)

Tablo 8. İnsan ve Hayvan Türlerinin Normal Serum Total Kolesterol ve Triaçilgliserol Konsantrasyonları (mmol/L).

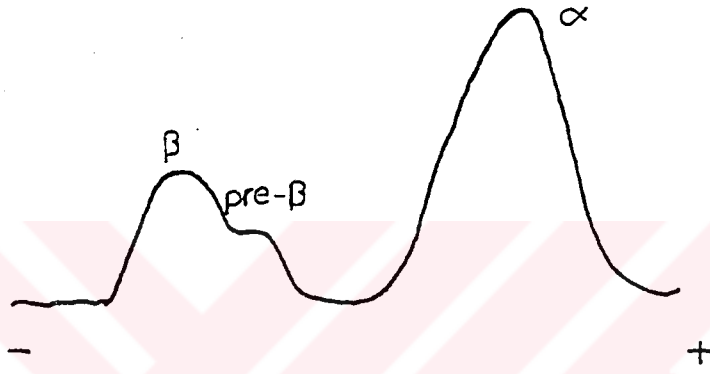
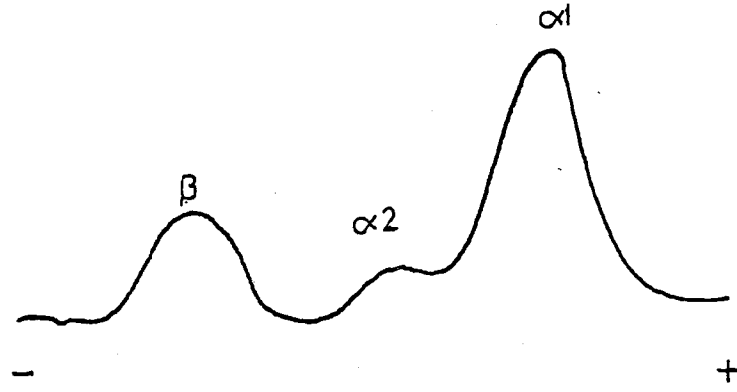
	<u>İnsan</u>	<u>Siğir</u>	<u>Koyun</u>	<u>Keçi</u>	<u>Kedi</u>	<u>Köpek</u>	<u>At</u>	<u>Tavuk</u>
Total Kolesterol	2.8-8.3	2.07-3.11	1.35-1.97	2.07-3.37	2.46-3.37	3.50-6.99	1.94-3.89	4.75
Triaçilgliserol	0.9-2.0	0.17-0.51	0.15-0.79	-	0.57-1.14	0.57-1.14	1.14-5.70	-

(47.literatür)

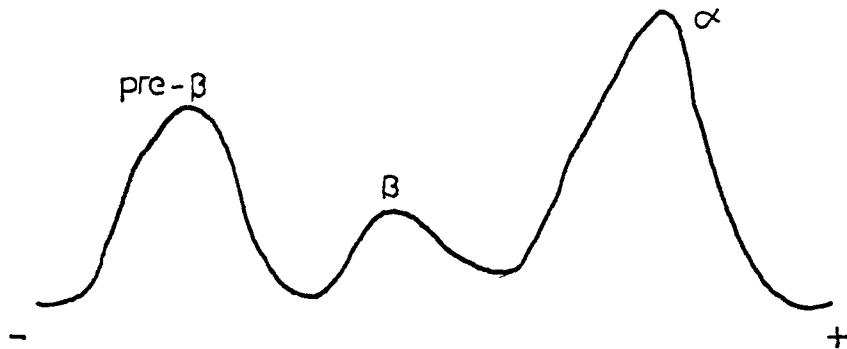


Şekil 2. Agaroz Jel Elektroforez ile Separe Edilen Serum Lipoproteinlerinin Densitometrik görünüşleri (a:11, b:32, c:62, d:11)

KÖPEK*



TAVUK**



Şekil 3. Agaroz Jel Elektrofrez ile Separe Edilen Serum Lipoproteinlerinin Dansitometrik görünüşleri (*72, **41)

salınırlar. Şilomikronlar bağırsak hücreleri arasındaki boşlukları geçerek sonunda bağırsağı direne eden lenfatik sisteme ve buradan da sirkülasyona salgılanırlar. Şilomikronlar başlıca apo B-48, apo E ve apoCI-CIII'ü içerirler. Şilomikronlar, heparan sülfat zincirleri vasıtasıyla kapillar duvarlarına bağlı olan ve doku enerji metabolizması için gerekli olan serbest yağ asitleri ve monoaçilgliserollerin salınımını katalize eden lipoprotein lipaz (LPL) enzimi aracılığıyla daha küçük şilomikron remnantlara (şilomikron artıkları) dönüştürler. Bu esnada triaçilgliserollerinin %90'mı ve HDL'e nakledilmek üzere apo A ve C'lerini kaybederler; ancak apo E ve B-48 remnant partikülünde kalır. Meydana gelen şilomikron remnantlar ana şilomikronun çap olarak yaklaşık yarısıdır ve yüzde bileşimi, triaçilgliserol kaybı nedeniyle kolesterol ve kolesteril esterleri yönünden nisbi olarak daha zengindirler. Apo B-48 ve apo E içerirler. Şilomikron remnantları apo E'yi bağlayan karaciğerdeki sellüler bir reseptör vasıtasıyla [apo E remnant reseptörü veya LDL reseptörü veya LDL-reseptör-related protein (LRP)] alınır. Normalde, şilomikronlar yemekten 8 saat sonra dolaşımdan uzaklaştırılırlar (13, 22, 35 60, 74).

2.1.5.2. Endojen Lipidlerden Kaynaklanan Lipoproteinler

Yemekten sonra, şilomikron artıkları karaciğer tarafından alınır. VLDL, karaciğerde endojen lipidlerden üretilir.

Şilomikronların bağırsak hücresi tarafından oluşturulma mekanizması ile VLDL'in karaciğer parankim hücreleri tarafından oluşturulması arasında bir çok benzerlik vardır. Farklı olarak VLDL, karaciğer parankim hücreleri tarafından Disse boşluğuna ve buradan da endotel aralıktan karaciğer sinüzoidlerine salgılanır.

Şilomikronların ve VLDL'in boyutu, partikül halindeki lipidin hidrolize olmadan kapillerlerin endotel hücrelerinden geçemeyişleri, besinlerle alınan yağın dolaşıma portal sistem aracılığıyla değil de lenfatikler (ductus thoracicus) yolu ile girme nedenidir. VLDL'ler de büyük fakat şilomikronlardan daha küçük, triaçilgliserollerden zengin, hafif partiküllerdir ve kan dolaşımında LPL aracılığıyla yıkılandıktan sonra çeşitli dokulara enerji veya depolanmak amacıyla gönderilirler. VLDL'ler başlıca apo E, apo B-100 ve apoCI-CIII'ü içerirler. Metabolizması şilomikronlara çok benzer. VLDL'in triaçilgliserolleri LPL tarafından yıkılandığında intermedier dansiteli lipoproteinleri (IDL'leri yada VLDL remnantları) meydana getirirler. VLDL, IDL'nin prekürsörü ve IDL ise LDL'in prekürsürüdür. Her LDL partikülü bir VLDL partikülünden köken alır. IDL'ler triaçilgliserol ve kolesterolün eşit miktarlarını

içerirler. IDL'in metabolizması 2 farklı şekilde cereyan edebilir: 1) IDL'ler karaciğer tarafından doğrudan apo B-100, E (LDL reseptör olarak da isimlendirilen) reseptörü ile alınır. Sonuç olarak, IDL'ler çabucak sirkülasyondan uzaklaştırılırlar. Tüm VLDL'ler ve IDL'ler normalde yaklaşık 4 saat içinde sirkülasyondan uzaklaştırılırlar. 2) IDL, kolesterolden zengin ve sadece apo B içeren düşük dansiteli lipoproteinleri (low density lipoprotein: LDL) şekillendirir. Bunlar LDL reseptörü tarafından sirkülasyondan çok yavaş bir şekilde uzaklaştırılırlar (13, 35, 60,74).

Diğer 2 lipoprotein karaciğerde sentezlenir. Bunlar **lipoprotein (a)** (Lp[a]) ve **HDL**'dir. Lp(a), apo (a) olarak isimlendirilen oldukça fazla heterojen glikozile bir apolipoproteine disülfid bağıyla bağlı bir LDL molekülünden ibarettir. Apo (a), şeker artıklarının sayısına bağlı olarak 280.000-800.000 Dalton arasında bir moleküler ağırlığa sahiptir. Sonuç olarak, Lp (a)'nın birçok izoformu mevcuttur. Çekirdek proteini yaklaşık 235.000 Daltondur. Bu yapısıyla doğal trombolitik ajan olan plazminojene benzer (13).

HDL, hem karaciğer hem de bağırsakta sentezlenir ve salgılanır. Ancak bağırsak kökenli olgunlaşmamış HDL (nascent HDL) apolipoprotein C veya E içermeyip sadece apolipoprotein A içerir. Böylece apo C ve E karaciğerde sentezlenip intestinal HDL plazmaya girdiğinde buna aktarılır. HDL'in önemli bir işlevi, şilomikronlar ve VLDL metabolizmasında gerekli olan apolipoprotein C ve E için bir depo görevi görmesidir (61). HDL 3 alt sınıfa ayrılır : HDL1, HDL2 ve HDL3. HDL2 ve HDL3 temel HDL popülasyonlarıdır. HDL2, HDL3'den ~ %50 daha büyüktür. Bundan dolayı HDL2 HDL3'den 3-4 kat daha fazla kolesterol ester ve triaçilgliserol molekülü içerir (30).

Olgunlaşmamış HDL, apolipoprotein ve serbest kolesterol içeren disk şeklinde çift tabakalı fosfolipidden oluşur. Lesitin : kolesterol açiltransferaz (LCAT) ve LCAT aktivatörü apolipoprotein A-I diske bağlanır. LCAT, yüzey fosfolipidi ve serbest kolesterolü, kolesterol ester ve lizolesitine dönüştürür. Polar olmayan kolesterol esterleri hidrofobik iç bölüme geçerken lizolesitin plazma albüminine aktarılır. Reaksiyon polar olmayan bir çekirdek oluşturarak devam eder. Polar lipidler ve apolipoproteinler ile kaplı bir yüzey filmi oluşturarak küresel HDL oluşur. Esterleşmiş kolesterol, HDL'den düşük dansiteli lipoproteinlere, örneğin şilomikronlar, VLDL ve LDL'e, HDL'in diğer bir protein bileşeni olan kolesterol ester transfer proteini (CETP: apo D) ile aktarılır. Böylece kolesterol ester transfer proteini, HDL'in kolesterol esterinin, şilomikron, IDL veya LDL aracılığıyla alınıp karaciğere taşınmasına olanak sağlar. Böylece LCAT sistemi, esterleşmemiş kolesterolün fazlasının lipoproteinler ve dokulardan

uzaklaştırılmasında gereklidir. Kolesteril esterini kaybeden HDL3'de oluşan konsantrasyon gradienti sonucu dokulardan ve diğer lipoproteinlerden kolesterolu alarak karaciğere kolesterol taşıdığı düşünülen HDL2'yi oluşturur. Küçük ve yoğun olan HDL3'ün aksine HDL2 daha büyük ve az yoğundur (60). Kısaca HDL3 ve HDL2'nin birbirlerine dönüşümüne bakılacak olursa;

HDL3 , fosfolipid, serbest kolesterol ve Apo C'yi LPL aracılığıyla hücrelerden alır ve ara dansiteli HDL2'ye dönüşür. Ara dansiteli HDL2, serbest kolesterol ve fosfolipid'in LCAT aracılığıyla kolesterol esteri ve lizolesitine dönüşmesiyle HDL2'ye dönüşür. Kolesteril esterinden zengin HDL2, CETP aracılığıyla kolesteril esterini triaçilgliserolden zengin VLDL'e verir ve karşılığında triaçilgliserolu alarak triaçilgliserolden zengin HDL2'ye dönüşür. Bu dönüşüm sırasında HDL2'nin boyutu ve dansitesi azalmaz, aksine geçici bir artış oluşur. Başta hepatik lipaz (HL) olmak üzere LPL tarafından da transfer edilen triaçilgliserollerin hidrolizi HDL2'nin boyut ve dansitesinde azalışla sonuçlanır. Apolipoproteinlerin uzaklaştırılmasıyla müteakip fosfolipolizis, triaçilgliserol hidrolizi ve triaçilgliserollerle kolesteril esterlerinin yer değiştirmesi HDL2'nin tam olarak HDL3'e dönüşümüyle sonuçlanır (30). Bu nedenle HDL doku kolesterolünün karaciğere taşındığı ters kolesterol transportunda önemli bir rol oynar. HDL konsantrasyonları koroner ateroskleroz insidansı ile ters ilişkilidir (60).

2.1.6. Tavuk Lipoproteinlerinin Metabolizması

Kuşlardaki lipidin metabolizması insanlardan 2 yönden farklılık gösterir. İlk olarak, memelilerde lenfatik sistem aracılığıyla şilomikronlar olarak taşınan ekzojen lipidler kuş türlerinde, büyük VLDL yada portomikronlar olarak portal sistem aracılığıyla kana taşınırlar. Kuşlar ve çoğu memeliler arasındaki ikincil temel fark, karaciğerin kuşlarda lipogenezisin temel bölgesi olmasıdır. Oysa lipid biyosentezi memelilerde hem karaciğer hem de adipoz dokuda olmaktadır. Bu faktörlere ilaveten, kuşlarda yumurta sarısı lipidinin prekürsörleri olarak belli serum lipoproteinleri kullanılmaktadır. Bu da aktif yumurta oluşumunun periyotları esnasında serum lipoprotein profilinin araştırılmasına neden olmuştur (19).

Piliçlerde fonksiyonel lenfatik bir sistemin bulunmayışından dolayı enterositlerde sentezlenen ve memelilerdeki şilomikronların karşılığı olan VLDL partiküllerinin sirkülasyona portal sistem yoluyla dahil oldukları tespit edilmiştir. Bu lipoprotein partiküllerine ilk olarak " portomikronlar" isminin Bensadoun ve Rothfield tarafından verildiği bildirilmiştir (1). Tavuklardaki ve diğer hayvanlardaki kan

lipoproteinlerinin kalitatif ve kantitatif yönleri üstüne bilgiler Chapman (19) tarafından 1980 yılında derlenmiştir. Yumurtlamayan tavuklarda ve yavru horozlarda diğer türlerdeki karşılıkları olan immünolojik olarak 3 farklı lipoprotein identifiye edilmiştir. Bunlar VLDL, LDL ve HDL lipoproteinleridir ve sırasıyla ortalama 60, 120 ve 360 mg/100ml plazma konsantrasyonunda bulunurlar. Yumurtlamanın başlangıcında, VLDL konsantrasyonları 1400mg / 100ml plazma seviyesine yükselirken, HDL yaklaşık olarak yarıya iner. Yumurtlayan tavukların plazması vitellogen olarak isimlendirilen ve fosfitin ile lipovitellin kısımlarından oluşmuş bir lipofosfoprotein içermektedir. Bu lipofosfoprotein ve VLDL yumurta sarısı lipidlerinin prekürsörüdürler.

Yumurtlayan tavuğun plazmasındaki VLDL'nin yüksek konsantrasyonları, yumurtlamanın başlangıcında oluşan hormonal değişikliklere cevap olarak karaciğerdeki artan sentezin bir sonucudur. Önceki çalışmalarda bu değişikliklerin tamamen östrojenlerin etkilerinden dolayı olmadığını gösterilmesine rağmen, yavru horozlarda yapılan son çalışmalar lipit metabolizması üzerine östrojen uygulamasının, yumurtlamanın başlangıcında olan tavuklardakine benzer etkiler ürettiğini göstermiştir (1).

Plazma lipoproteinlerinin lipit komponentleri üzerine yapılan çalışmalar, yavru horozlar, yumurtlamayan ve yumurtlayan tavuklarda VLDL, LDL ve HDL'deki büyük lipit sınıflarının oranlarının benzer olduğunu göstermiştir. Yumurtlayan tavuklardaki ovaryum folikülleri ve plazmanın lipit komponentleri üstüne yapılan daha detaylı çalışmalar, lipit kompozisyon ve yapısında benzerlikleri ortaya koymuştur. Her bir örnekteki lipitlerin yaklaşık %67'sinin triaçilgliserol, %30'unun fosfolipid'den ve %3'ünün de küçük lipit sınıflarından ibaret olduğu belirlenmiştir. Bu bilgiler, plazma lipoproteinlerinin yumurta foliküllerde parçalanmamış olarak depolandığı görüşünü desteklemiştir. Elektron mikroskobuna dayalı ilk çalışmalar, parçalanmamış lipoproteinlerin gelişen ovuma pinositozisle girdiğini ileri sürmüştür (1).

Lipoproteinlerdeki triaçilgliserollerin hidrolizi, ekstrahepatik dokulara triaçilgliserol yağ asitlerinin transferinde esansiyel bir basamaktır. Meme ve adipoz dokudaki çalışmalar, triaçilgliserol alınımı ve LPL aktivitesi arasında iyi bir korelasyonun mevcut olduğunu ve enzimin aktivasyonunun fonksiyonel bölgesinin kapiller endotellerinin luminal yüzeyinde olduğunu göstermiştir. Tavuk adipoz doku LPL'ı için LPL'in yüksek spesifiteli inhibitörleri olarak fonksiyon gören antikorları

kullanarak LPL'in dokulara plazma triaçilgliserol yağ asitlerinin transferi için zorunlu olduğunu belirlemişlerdir (1).

Gelişen ovaryum oositine kandan triaçilgliserol yağ asitlerinin transferinin lipoprotein lipaz (LPL) aracılığıyla olduğu gösterilmiştir. Triaçilgliserol transferi kuşlarda LPL antikollarının enjeksiyonu ile bloke edilmiştir. Bu bulgu lipidin gelişmiş oosit içine plazma lipoproteinlerinden transfer edilme mekanizmasının diğer dokular tarafından lipidin alınımı ile aynı olduğunu göstermektedir (1).

Yumurtlayan türlerde yumurta sarısı embriyonun gelişimi için zorunlu besinleri içerir. Yumurta sarısı komponentlerinin çoğu östrojenin kontrolü altında karaciğerde sentezlenen plazma prekürsörlerinden köken alır. Tavuklarda, temel yumurta sarısı prekürsörleri lipoproteinlerdir. VLDL ve vitellogenin (VTG)'in, plazma düzeyleri, östrojen verilen horozlarda ve yumurtlayan tavuklarda oldukça artar. VLDL'in temel protein komponenti apo B, hem transkripsiyonal ve hem de translasyonel düzeylerde östrojenle güçlü bir şekilde indüklenir.

Plazmadan yumurta sarısı prekürsörlerinin (VLDL ve VTG) oositlerin büyümesiyle spesifik ve etkili alınımı, reseptör-bağlantılı endositozis aracılığıyla oluşur. Oositlerde bulunan anahtar molekül 95kDa büyüklüğünde bir reseptördür ve her iki lipoproteinin alınımından sorumludur (82).

2.2. LİPOPROTEİNLERİN SEPARASYON TEKNİKLERİ

Lipoproteinler; ultrasentrifügasyon, presipitasyon, elektroforezis, kolon kromatografisi veya immunolojik prosedürler ile serum ya da plazmadan izole edilebilirler (63) (tablo 9).

2.2.1. Presipitasyon Tekniği ve Klinik Önemi

En sık kullanılan lipoprotein separasyon tekniklerinden biri de presipitasyon yöntemidir. Presipitasyon yöntemi, kolaylığı ve az zaman alması nedeni ile ultrasentrifüjle separasyon metoduna tercih edilmektedir.

Lipoproteinlerin glikozaminoglikanlar (GAG), sodyum fosfotungstat ve nötral polimerler ile moleküler kompleksler meydana getirdikleri bilinmektedir (23). Bu özelliklerden istifade edilerek, lipoproteinlerin serumdan presipitasyonla separasyonları sağlanmıştır.

İnsanlarda özellikle atherosklerozis ve koroner arter hastalığında hiperlipoproteinemia'nın önemi bilinmektedir. Hiperlipoproteinemia; diabetes mellitus,

Tablo 9. Yüksek Dansiteli Lipoprotein'in (HDL) İzolasyonu İçin Metotlar (63)

Metot	Prensip	Kullanımı	Yorumlar
1. Ultrasantrifüjasyon	Plazma yada serumun dansitesi potasyum bromid ile 1.063g/ml'e ayarlanır ve 24 saat yüksek devirde santrifüj edilir. 1.063-1.21g/ml aralığında HDL fraksiyonundaki lipoproteinler separe edilir.	Özel araştırma laboratuvarları.	Referans metot, zahmetli ve çok zaman alır.
2. Kolon Kromatografi	HDL yükü (iyon-değiştirici) yada moleküler boyuta (jel filtrasyon) dayalı olarak izole edilir ve alt sınıflara ayrılır.	Özel araştırma laboratuvarları. Nadiren kullanılır.	Özellikle kromatografik şartları kontrol etmek zordur.
3. Nişasta Elektroforezi	HDL yük ve boyutuna göre diğer lipoproteinlerden ayrılır.	Nadiren kullanılır.	HDL'in büyük miktarlarının izolasyonu için kullanılır, (kantitatif amaçlar için değil)
4. Agaroz Jel Elektroforezi	HDL yük ve boyutuna göre diğer lipoproteinlerden ayrılır.	Seyrek kullanılır.	Klinik kullanım için yeterince hassas değildir.
5. Presipitasyon	Poliyanionlar(heparin, dekstran sülfat), fosfotungstat, polietilen glikol, divalent kationların varlığında, HDL'den daha büyük ve daha az yoğun lipoproteinleri presipite etmede kullanılır. HDL, HDL-kolesterolü olarak süpernatantta ölçülür.	Çok sık kullanılır.	
a) Heparin/MnCl ₂		Seyrek kullanılır.	Tercih edilen güncel metot, tüm kolesterol prosedürlerine uygun değildir.
b) Dekstran sülfat/MgCl ₂		Sıklıkla kullanılır.	Yüksek moleküler ağırlıklı olan düşük moleküler ağırlıklı olandan daha iyi sonuç verir.
c) Fosfotungstat		Çok sık kullanılır.	Isı dalgalanmalarına duyarlı HDL'i eksik hesaplar.
d) Polietilen glikol		Seyrek kullanılır.	Hassaslık ve doğrulukta yetersiz. Tavsiye edilmez.
6. Poliakrilamid jel elektroforezi	Yük ve boyutuna göre HDL diğer lipoproteinlerden ayrılır.	Seyrek kullanılır.	Muhtemelen HDL düzeylerini eksik hesaplar.

akut pankreatitis, hipotroidizm, enfeksiyonlar, gut ve bazı lipidozları içeren diğer hastalıkların da önemli bir komponentidir. Bu açıdan lipoproteinlerin separasyonu ve miktar tayini insan hekimliğinde lipit bağlantılı hastalıkların teşhisinde büyük öneme sahiptir.

Kolesterol ölçümü için HDL, genellikle polianyon ve divalent katyonlar ile (ör; heparin-mangan, dekstran sülfat-mağnezyum) apo B içeren lipoproteinlerin selektif presipitasyonu ile separe edilir (63, 86). HDL süpernatantda kalır ve süpernatantın kolesterol içeriği total HDL konsantrasyonunun ölçümünde kullanılır. HDL kolesterolü ölçüldükten sonra aşağıdaki Friedewald (33) eşitliğine göre VLDL ve LDL kolesterolü hesaplanır (42) :

$$[\text{LDL kolesterol}] = [\text{total kolesterol}] - [\text{HDL kolesterol}] - \frac{[\text{triacilgliserol}]}{5}$$

5

2.2.2. Polianyon- Lipoprotein Etkileşimi

Belirli şartlar altında, düşük dansiteli lipoproteinler nötral pH'da sülfatlanmış polisakkaritlerle serumdan presipite edilirler. Suda çözünmeyen komplekslerin oluşumu sülfatlanmış amilopektin yada dekstran sülfat gibi yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklere ve heparin gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşiklere ilave edilen divalent katyonlar ile gerçekleşmektedir (16).

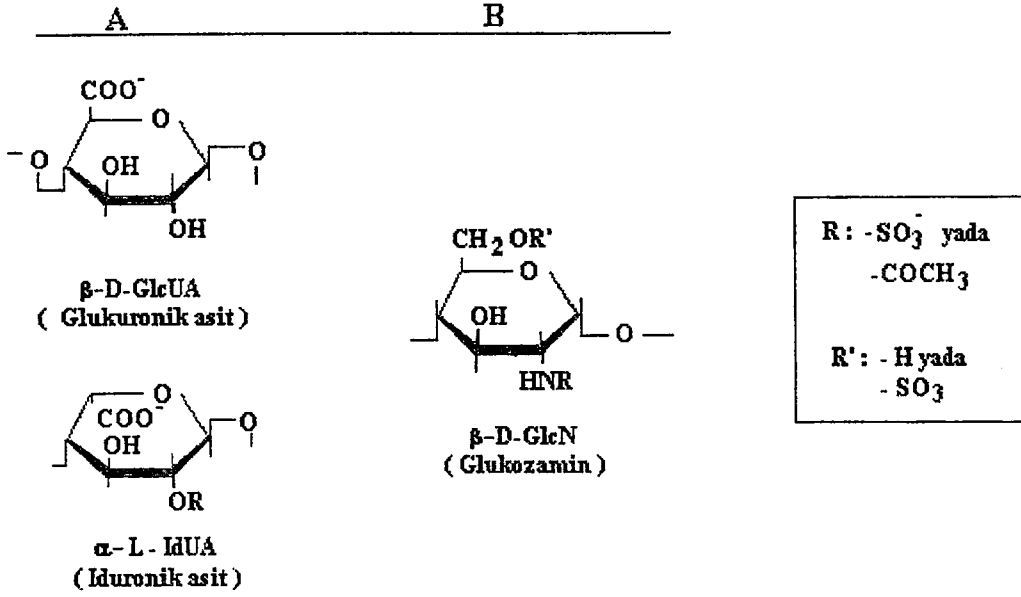
Sülfatlanmış polisakkaritler ve plazma lipoproteinleri arasındaki çözünmez komplekslerin şekillenmesinin 1955 yılında tespit edildiği bildirilmiştir. Bu komplekslerin nötral pH'da, organik solventlerin varlığında oluştuğu ve iyonik güç yada kompleks oluşumu için zorunlu gibi görünen belli metal iyonlarını uzaklaştıran şelasyon ajanlarının ilavesiyle yada iyonik gücün artışıyla kolayca çözülebildiği ortaya konulmuştur (15, 16, 23, 45).

Heparin

Bir takım polisakkarit zincirlerinin yaygın bir protein çekirdeğe bağlandığı klasik bir proteoglikandır (PG). Bununla birlikte, heparin mast hücrelerin granüllerinde depolanır ve bu nedenle intrasellüler olarak oluşur. Heparin, medikal önemi olan, bazı yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahiptir. Tekrarlayan disakkarit ünitesi olarak glukozamin (GlcN) ve bir üronik asit (UA) içerir. Glukoz artıklarının amino gruplarının çoğu N-sülfat'lıdır. Fakat bir kaçısı asetiledir. GlcN, C₆'da bir sülfat esteri de taşır. Üronik asit artıklarının yaklaşık %90'ı İduronik asit'dir (IdUA); sadece %10'u glukuronik asit'dir (GlcUA). Heparin proteoglikanının protein molekülü tektir. Serin ve

glisin artıklarından ibarettir (49,56). Heparin ticari olarak sığır akciğer yada domuz intestinal mukozasından elde edilir. Moleküler ağırlığı 6000-30.000 Da arasındadır. Heparin aşağıdaki monosakkaritlerin tekrarlanması ile oluşur (56) :

Tekrarlayan Monosakkarit Üniteleri



Dekstran Sülfat

Dekstran sülfat (DS) her glukoz molekülüne bağlı 3 sülfat grubuyla yaklaşık %17 kükürt (S) içeren heparin benzeri bir polisakkarittir. Heparinin sentetik analogudur ve heparin-Mn²⁺ ile iyi bir korelasyon sergiler. Moleküler ağırlığı 4000-500.000 arasında değişir. Önceki araştırmalar lipoprotein presipitasyonunun DS'in moleküler ağırlığının bir fonksiyonu olduğunu göstermektedir. Daha büyük DS molekülü, lipoproteinleri presipite etmeye daha fazla eğilimlidir (87).

Sülfatlanmış polisakkaritler ile lipoproteinlerin ilişkisini etkileyen faktörler arasında lipoprotein türü ve polisakkaridin niteliği kadar pH, iyonik güç ve metal iyonlarının türünü de saymak mümkündür (16).

pH ve İyonik güç: Sülfatlanmış polisakkaritler, izoelektrik noktalarının asit kısmında birçok proteinle etkileşirler. Diğer yandan fibrinojen, albümin ve bazı lipoproteinler de izoelektrik noktalarının alkali bölgesinde moleküler kompleksler oluştururlar. Fibrinojen- sülfatlanmış polisakkarit kompleks oluşumunu elimine etmek için lipoproteinlerin araştırılmasında serum tercih edilmektedir. Sülfatlanmış polisakkaritler plazmadan β lipoproteinleri seçici olarak presipite ederler. Albümin, lipoproteinlerin preipitasyon metotları ile izolasyonlarında presipitasyona engel teşkil etmeksizin sülfatlanmış polisakkaritlerle çözünür kompleksler oluşturur.

Presipitasyon proteinin izoelektrik noktasına ve pH'sına bağlı olarak şekillenir. İzoelektrik nokta pH'sı 5.7 olan Sf 0-10 ya da β lipoprotein fraksiyonu alkali solüsyonlarda heparinle çözünür bir kompleks oluşturur ve izoelektrik noktasının altında ya da o noktada çözünmez bir kompleks oluşturur. Bu pH'da bir çok protein presipite olduğundan reaksiyon şartları nötral – alkali pH sınırında lipoproteinlerin seçici olarak presipitasyonu için ayarlanmaktadır. Bu da spesifik metal iyonlarının ilavesiyle ya da alkali pH'da lipoproteinleri presipite eden sülfatlanmış polisakkaritlerin kullanılmasıyla sağlanmaktadır.

Bazı lipoprotein-sülfatlanmış polisakkarit ilişkilerinin spesifitesi iyonik gücün bir fonksiyonudur. Bu nedenle heparin ve CaCl_2 serumdaki şilomikronları çöktürür, fakat iyonik güç azaltılmaksızın β lipoproteinler presipite olmaz. Diğer serum proteinleri, düşük iyonik güçte, protein-sülfatlanmış polisakkarit-metal iyon kompleksleriyle birlikte presipite olabileceği için iyonik gücün kontrolü lipoproteinlerin seçici presipitasyonunda önemlidir. Çözünmez lipoprotein sülfatlanmış polisakkarit kompleksleri yüksek iyonik güçlü solüsyonlarda çözünürler.

Metal iyonları: Çözünmez lipoprotein-sülfatlanmış polisakkarit komplekslerinin oluşumu ortama metal iyonlarının ilavesine bağlıdır. Heparin ve düşük moleküler ağırlıklı dekstran sülfatın her ikisi de pH 5.7'de lipoproteinlerle çözünür kompleksler oluştururlar. Çözünmez kompleksler spesifik metal iyonlarının ilavesiyle pH 6.5-8.5 sınırında şekillenir. Lipoprotein-sülfatlanmış polisakkarit-metal iyon kompleksleri yaklaşık pH'9 da çözünür hale gelir. Metal iyonları, pH ve iyonik gücün hepsi kompleks oluşumunun spesifitesine yardım eder.

Metal iyonları 2 grup içinde ele alınır:

a) **Toprak Alkaliler (Mg^{+2} , Ca^{+2} , Sr^{+2} ve Ba^{+2})** : Bu metaller karboksil ve sülfat gruplarıyla ilişkiye girerler.

b) **Geçiş elementleri (Mn^{+2} , Co^{+2} ve Ni^{+2})** : Proteinin imidazol ve amino grupları gibi nitrojen içeren bağlarla kompleksler oluşturmaya meyillidirler. Metal iyonlarının proteinlerle kompleks oluşturduğu ve molekülün pozitif yüküne katkıda bulunduğu farzedilebilir. Bu nedenle sülfatlanmış polisakkaritlerle çözünmez komplekslerin şekillenmesinde bu iyonların etkisi hidrojen iyonlarının etkisine az çok analogdur.

Metal iyonlarının ilavesinin bazı sülfatlanmış polisakkaritlerle β lipoproteinlerin presipitasyonu için gerekli olmasına rağmen, onların varlığı bazı araştırmacılar tarafından

zorunlu görülmemektedir (16). Metal iyonları ilave edilmeksizin bazı sülfatlanmış polisakkaritlerle de serum lipoproteinlerinin presipite edilebileceği bildirilmiştir. Çünkü serumda zaten mevcut olan Ca^{+2} un yeterli olduğu düşünülmüştür. Suda çözünmeyen lipoprotein-sülfatlanmış polisakkarit-metal iyon kompleksleri, sitrat yada okzalat gibi şelasyon yapan ajanların ilavesiyle kolayca çözülebilir. Çözünme, iyonik gücün artışıyla ve Ba^{+2} yada protamin tuzları ile sülfatlanmış polisakkaridin selektif olarak presipite olmasıyla gerçekleşir (16).

Sülfatlanmış Polisakkaridin Yapısı: Polimerizasyonun derecesinin ve sülfat içeriğinin kompleks formasyonunu etkileyen 2 büyük faktör olduğu tespit edilmiştir. Sülfatlanmış polisakkaritler natif olanlara göre lipoproteinlerle daha güçlü kompleksler oluşturur. Sülfat grupları az olan polisakkaritlerin de artan konsantrasyonları presipitasyonu arttırılabilir (16).

Polisakkaridin kimyasal kompozisyonunun moleküler kompleksin yapısını etkilediği ileri sürülmüştür. Karboksil grupları içeren sülfatlanmış polisakkaritler, sadece geri dönüşümsüz-çözünür kompleksler şekillendirirler. Moleküler kompleks, N-asetil ve N-sülfatil heksozamin artıklarını içeren sülfatlanmış polisakkaritlerin mevcudiyetinde geri dönüşümlü-çözünür tipindedir (16).

Dekstran sülfat ve heparin gibi sülfatlanmış polisakkaritlerle lipoproteinlerin ilişkisi hem çözünür hem de çözünmez komplekslerin şekillenmesiyle sonuçlanabilmektedir. Lipoproteinlerin ve sülfatlanmış polisakkaritlerin ilişkilerinin sonucu oluşan moleküler komplekslerin 3 ayrı grup olarak düşünülmesi mümkündür:

- a) Çözünmez kompleksler
- b) Geri- dönüşümlü çözünür kompleksler
- c) Geri-dönüşümsüz çözünür kompleksler

Burstein (16), sülfatlanmış polisakkaritler ve metal iyonlarıyla düşük dansiteli lipoproteinlerin presipitasyonunun serumun iyonik gücünün azaltılmasıyla kolaylaştırılacağını ve arttırılarak inhibe edileceğini göstermiştir. Aynı durum yüksek dansiteli lipoproteinler için de geçerlidir. NaCl'ün ilavesiyle serum iyonik gücündeki artış presipitasyonu inhibe etmektedir. Bu inhibisyon hem polianyon hem de divalent katyon konsantrasyonlarını arttırarak belli bir dereceye kadar aşılabilir. Sülfatlanmış polisakkaritler ve belli plazma lipoproteinleri arasındaki çözünmez kompleksler, organik solventlerin varlığında ve nötral pH'da meydana gelir ve iyonik güç artışlarıyla yada kompleks oluşumu için gerekli olan belli metal iyonlarını uzaklaştıran şelasyon

ajanlarının ilavesi ile kolayca çözünebilir. Plazma lipoproteinlerinin saflaştırılması ve izolasyonu için presipitasyon metotları, bu duruma dayandırılarak geliştirilmiştir (16).

Lipoprotein-Polianyon/Divalent Katyon İlişkisinin Prensibi:

Polianyonların divalent katyonlarla birlikte lipoproteinleri presipite etmesinin spesifik mekanizması kesin olarak kanıtlanmamıştır. Bununla birlikte lipoproteinlerin protein kısımları üzerindeki pozitif yüklü guruplar ve polianyonlar üstündeki negatif yüklü guruplar arasındaki ilişki muhtemelen önemlidir. Divalent metal iyonları, suda çözünmeyen komplekslerin oluşumunu kolaylaştırmak için lipoproteinler üstüne negatif olarak yüklü guruplarla (fosfolipidler gibi) etkileşir. Daha büyük, lipidden zengin lipoproteinler, (VLDL, LDL) proteinden zengin HDL gibi daha küçük olandan çok daha kolay çözünmeyen kompleksler oluşturur. LDL ve polianyonlar arasındaki ilişkinin 2 şekilde olduğu öne sürülür : a) Çözünür kompleksler oluşturmak için polianyondaki asidik guruplar ve apolipoproteinlerdeki bazik amino gurupları arasındaki bağ oluşumu, b) Polianyondaki asidik guruplarla divalent katyonların birleşmesi ve LDL'in fosfolipid oranına bağlı olarak çözünmez komplekslerin oluşumu için çapraz bağlantıların oluşumu. Çözünmez kompleksler, düşük hızlı santrifügasyonla çöktürülebilirler (56).

Ayrıca, LDL ve Glikozaminoglikan (GAG)'lar arasındaki ilişki, GAG'ın negatif yüklü sülfat ve karboksil gurupları ile LDL'deki en önemli protein olan apo B-100'deki lizin ve arginin gibi bazik amino asit artıkları arasındaki iyonik güçlerle açıklanmaktadır. LDL'deki diğer bir protein içeriği de apo E'dir. Apo E de hem LDL reseptörüne hem de heparine bağlanmaktadır. Heparinin yapısında bulunan sülfat ve karboksil gurupları, apo E peptidindeki lizin ve arginin artıkları arasında güçlü bir elektrostatik ve hidrojen bağı kurmaktadır. Heparin gibi LDL reseptörü de fazlaca asidik bir moleküldür. Bundan dolayı GAG'a benzer. LDL reseptörü üzerindeki aspartik ve glutamik asit gibi amino asitlerin karboksil guruplarının heparindeki yada kondroitin-6 sülfattaki sülfat guruplarına benzer şekilde apo B ve E'deki bazik artıklarla (lizin, arginin) iyonik ilişkiler oluşturduğu kabul edilmektedir (45, 56).

Özet olarak, divalent katyonların varlığında sülfatlanmış polisakkaritler nötral pH'da tüm lipoprotein sınıflarını (şilomikron, VLDL, LDL ve HDL) presipite edebilmektedir. Bu presipitasyon anyon ve katyonların yapısına, ayrıca konsantrasyonuna ve iyonik güce bağlıdır. Şilomikron ve VLDL ile çözünmez bir kompleksin oluşumu (lipoprotein-polianyon-katyon) LDL'den daha kolay ve LDL ile kompleks şekillenmesi de HDL'e göre daha kolaydır (16). Protein/lipid oranı HDL'den

şilomikronlara doğru azalır. Bu oran düştüğü zaman çözünmez kompleks daha kolay şekillenir. Anyon ve katyonların belirli konsantrasyonlarının tüm lipoproteinleri presipite etmesine rağmen, gerekli miktarlar aynı değildir (şilomikron < VLDL < LDL < HDL). Bu sebepten dolayı sülfatlanmış polisakkarit konsantrasyonlarını basamak basamak arttırarak serum lipoproteinlerinin farklı sınıflarını izole etmek mümkündür. İyonik gücün değişmesi ile şilomikronların, VLDL ve LDL'in ayırıcı presipitasyonu yapılabilir (16).

Sodyum Fosfotungstat

Düşük dansiteli ve yüksek dansiteli lipoproteinlerin fosfotungstik asidin sodyum tuzuyla (NaphT) da presipite edildiği bildirilmiştir (4,15, 16, 18, 37, 88). NaphT heparin gibi nisbi yüksek moleküler ağırlığı ve negatif yükü sebebiyle lipoproteinlerle kompleks teşkil eder (Fosfotungstik asit : $24WO_3 \cdot 2H_3PO_4 \cdot 48H_2O$ su değişkendir.). Na-fosfotungstat / Mg^{+2} ile LDL'in presipitasyonu, sülfatlanmış polisakkaritlerden farklı olarak serumun iyonik gücünün arttırılmasıyla inhibe edilemez (23). Tersine Burstein ve ark. (15) Na-fosfotungstat ve NaCl'ün yüksek konsantrasyonlarında tüm düşük dansiteli lipoproteinlerin divalent katyonlar ilave edilmeksizin nötral pH'da presipite edildiğini göstermişlerdir.

Polietilen Glikol

Lipoproteinlerin presipitasyonunda dekstran ve polietilen glikol (43, 50, 59, 83, 97) gibi nötral polimerler de kullanılmaktadır. Polietilen glikol $[H(OCH_2CH_2)_nOH]$ ticari olarak farklı moleküler ağırlıklara sahip (190-20.000 M.W) nötral bir polimerdir. Nötral polimer ile kompleks oluşumunun hidrojen bağları ile meydana geldiği ileri sürülmüştür (16). Yüksüz, suda çözünen polimerler tarafından protein presipitasyonunun yeni bir tipi tanımlanmıştır. Buna göre, polietilen glikol , polimerin konsantrasyonuna bağlı olarak proteinleri presipite etmektedir. Bazı yüksüz suda çözünen polimerler, (polietilen glikol, moleküler ağırlığı 500, 4000, 6000, 20.000 ve 10^6 ; polipropilenglikol moleküler ağırlığı 400, 500 ve polivinilprolidon) insan serum proteinlerini ve lipoproteinlerini presipite eder. Polimerle protein arasındaki ilişki; pH, iyonik güç, protein konsantrasyonu ve mevcut iyonun tipleri gibi bir çok değişkenle kontrol edilir. Polimerin ortalama moleküler ağırlığı ve konsantrasyonu da protein presipitasyonunu etkiler. Bu şartlar altında , parametreler kontrol edildiğinde proteinin molekül ağırlığı büyüdükçe, daha küçük polimer konsantrasyonunun presipitasyon için

gerekli olduğu görülür. Polimerin moleküler ağırlığı büyüdükçe, proteinin presipitasyonu için gerekli konsantrasyonu da küçülmektedir (83).

2.3. AMAÇ

Hiperlipidemia ile ilişkili metabolik bozuklukların araştırılması, plazma lipoproteinlerinde hem kalitatif hem kantitatif değişikliklerin tanımlanmasını gerektirir. Kalitatif değişiklikler genellikle elektroforetik mobilitedeki değişikliklere göre değerlendirilmektedir; fakat ultrasantrifügasyon ve presipitasyon tekniklerinin kullanımıyla lipoprotein sınıflarının özellikle lipid kompozisyonlarının kantitatif analizi kolaylaşmıştır (6).

Koroner arter hastalığı için bir risk faktörü olarak HDL kolesterolünün ölçümü son yıllarda oldukça önemli olmuştur (21). HDL kolesterol ölçüm metotları, klasik ultrasantrifüj prosedürleriyle karşılaştırılarak kısmen doğrulanmıştır. Ultrasantrifügasyon tekniklerinin referans olarak kullanılmasına rağmen, pahalı oluşu, ekipman ve beceri gerektirmesi ayrıca uzun zaman alması rutin labotaruvarlar için uygun değildir (87). Bununla birlikte, ultrasantrifügasyon ile 1.063-1.210 g/ml'lik dansite aralığında izole edilen HDL'de bazı problemler mevcuttur :

a) HDL bu dansite aralığında diğer lipoproteinlerle kontamine edilir. b) Lipoproteinlerin yeniden eldesi genellikle %90'dan daha azdır. c) Yüksek tuz konsantrasyonlarının kullanımı lipoproteinlerin özelliklerini değiştirir. Bunun için ultrasantrifügasyon yada herhangi bir diğer metot referans prosedür olarak kullanılmaya uygun değildir (93).

HDL homojen bir lipoprotein değildir. Daha ziyade, tüm lipoprotein sınıflarının en heterojen olanıdır. Genellikle HDL2 ve HDL3 gibi en az 2 alt sınıfa sahip olduğu kabul edilmektedir. Aslında, ultrasantrifügasyon dansite gradienti ile ayrılan HDL 12 alt fraksiyona ayrılır. Bu heterojenite değişik HDL kolesterol metotları arasındaki ayrılığın nedenini teşkil etmektedir (93). HDL'in rutin izolasyonu için polianyonlar ya da divalent katyonlarla kombine sülfatlanmış polianyonlar ile (deterjanlar yada nötral polimerler) apolipoprotein B içeren lipoproteinlerin seçici presipitasyon metotları tercih edilmektedir. HDL, presipitasyon sonrası süpernatantta kalan kolesterol olarak ölçülür (21, 25).

Ultrasantrifügasyon metoduyla karşılaştırıldığında presipitasyon metotları daima aynı sonucu vermezler. Bunun başlıca sebepleri : Apo B içeren lipoproteinlerin tam olarak presipite olmaması, α lipoproteinlerin kopresipitasyonu, $d > 1.063$ g/ml

fraksiyonda apo B içeren lipoproteinlerin varlığı ve presipitasyon ayraçlarının ayrıca ultrasantrifügasyon prosedüründe kullanılan KBr'ün kolesterol ölçümünde engel teşkil etmesidir (25).

Çoğu klinik laboratuvarında HDL kolesterolü, VLDL ve LDL'in heparin, dekstran sülfat, sodyum fosfotungstat yada polietilen glikol ile presipite edilmesine dayalı metotlarla ölçülmektedir. Bu presipitasyon metotları ultrasantrifügasyon metotlarıyla uyumludur (65). Buna rağmen hangi metodun gerçek HDL kolesterol değerini vereceği sorusu hala bilinmemektedir (93).

İnsan plazmasından lipoproteinlerin separasyonu için geliştirilen teknikler her bir lipoprotein sınıfının fiziksel ve kimyasal özellikleri arasındaki farklılıklar yüzünden diğer türler için geçerli olmayabilir. Örneğin, belli şartlar altında LDL ile kopresipite olabilen, LDL'e benzer bir dansiteye sahip HDL'in apolipoprotein E'den zengin bir alt fraksiyonunun kanin plazmasındaki varlığı LDL ve HDL kolesterol konsantrasyonlarının ölçümü için kullanılan metodolojilerin bazısını geçersiz kılabilir (6). Hayvanlarda lipoprotein fraksiyonları üstüne yapılan çoğu çalışmalarda insan lipoprotein fraksiyonlarıyla karşılaştırılma yapılmıştır. Bunun için insan lipoproteinlerini separe etmek için dizayn edilen metotlar kullanılarak hayvan lipoproteinleri separe edilmiştir (69).

Hayvan türlerinin serumlarının çoğu insandan daha düşük total lipoprotein, β lipoprotein ve kolesterol konsantrasyonuna sahiptir. Buna rağmen çoğu hayvanda insandaki gibi 3 temel serum lipoprotein fraksiyonu gözlenmektedir. Bunlar; LDL, VLDL ve HDL'dir (84).

Heparin, dekstran sülfat, sodyum fosfotungstat ve polietilen glikol izolasyon prosedürlerinin farklı mekanizmalarla tüm kompleks lipoproteinleri presipite ettiği insan lipoproteinleri için kanıtlanmıştır. Fakat hayvan türlerine bu izolasyon prosedürlerinin uygulanışına dair sınırlı bilgi mevcuttur (11, 72).

Mevcut çalışmada insan lipoproteinleri için geliştirilen presipitasyon metotlarının hayvan lipoproteinlerine uyarlanması ve presipitasyon için kullanılan ayraç konsantrasyonları ve optimum şartlar tespit edilerek lipoprotein ayırımı için en uygun presipitasyon yöntemlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Veteriner hekimliğinde teşhis ve tedavinin önem arzettiği, ekonomik kayıplara yol açan bir takım hastalıklar karaciğer harabiyeti ile son bulmaktadır. Karaciğer hastalıkları diğer hastalıkların seyrini ve prognozunu olumsuz şekilde etkilemektedir. Karaciğer fonksiyon bozukluğu neticesinde birçok kan parametresi değişikliğe uğrar.

Plazma lipoproteinlerinin de başlıca sentez yeri karaciğerdir. Anormal serum lipit kompozisyonlarının, anormal karaciğer fonksiyonuyla ilişkili olması sebebiyle karaciğer hastalıklarının plazma lipoproteinlerinde değişikliğe yol açabileceği düşünülmektedir (75). Aynı zamanda karaciğer hastalığı sonucu oluşan anormal lipoproteinler, yapı, kompozisyon ve konsantrasyondaki göze çarpan değişikliklerden dolayı sellüler fonksiyonda önemli etkilere sahip olabilir. Plazma lipit konsantrasyonu yada kompozisyonundaki basit değişiklikler, lipoprotein metabolizmasında veya lipoproteinlerin elektroforetik kompozisyonlarında kompleks değişiklikler meydana getirir. Bu değişikliklerin analizi karaciğer hastalıklarının değerlendirilmesinde ve prognostik bir amaç için kullanılmasında yegane yoldur (40).

Bu anlamda uygulama kolaylığına sahip olan presipitasyon metodu ile lipoproteinlerin separasyonu, hayvan türlerinde lipit metabolizmasının değişik hastalıklarını belirlemede ve sınıflandırmada kullanılabilir. Örneğin; ketozisli sığırların serum lipoproteinlerinde bazı ciddi değişimler gözlenmiştir (29, 35). Karaciğerde hasar oluşturan hepatik lipidosi, tıkanma sarılığı, paranzimal karaciğer hastalığında da lipit metabolizmasında belirgin değişiklikler gözlenmiştir (34, 40, 61, 75). Kolik ve çimen hastalıklı atlarda total lipidlerde bir artışa paralel olarak, hipertriacilgliserolemi ve hiperkolesterolemi görülmektedir (62). Deneysel olarak oluşturulan karaciğer hastalıklı ponilerde serum lipit ve lipoprotein konsantrasyonlarındaki değişimler bildirilmiştir (10). Açlığa, şişmanlığa, strese, gebelik ve laktasyona bağlı olarak da ponilerde hiperlipidemia görülmektedir (90). Atlarda görülen laminitis'in podolojik bir problemenden ziyade sistemik bir sendrom olduğu ve lipit metabolizmasındaki bozukluklarla ilişkili olabileceği de bildirilmiştir (70). Lipid metabolizmasının primer ve sekonder bozuklukları köpeklerde ve kedilerde tanımlanmıştır. Köpeklerde, yemek sonrası hiperlipidemialar, pankreatitis, diabetes mellitus, renal hastalık, hipotiroidizm, kolestazis ve çok yüksek yağlı dietlerle ilişkili olabilir (6, 7, 9, 11, 28, 71, 72). Kedilerde bunlara hipersilomikronemia da eklenebilir (46).

Bahsedilen bu evcil hayvan dislipoproteinemialarının, ilgili hastalıkların teşhisinde ve prognozlarının takibinde polianyon presipitasyon yöntemlerinin serum lipit kompozisyonlarının tespitinde önemli faydalar sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca insanlarda HDL kolesterol ölçümü kardiyovasküler hastalıklar ve atherosklerozis için değerliken hayvan türlerinde de birtakım lipit metabolizması bozukluklarının teşhisinde değerlendirilebilir.

3.MATERYALVE METOT

3.1.MATERYAL

3.1.1. Kan Örneklerinin Alınması

Koyun, keçi, sığır kanı Elazığ ELET Kesimhanesi'ne gelen hayvanlardan, tavuk serumu Köytür Kesimhanesi'nden, kedi, köpek ve at kanı ise Fırat Üniversitesi Hayvan Hastanesi Dahiliye ve Cerrahi Kliniklerine gelen hayvanlardan temin edildi.

Kedi ve köpek hariç tüm türlerde kan vena jugularis'den alındı. Kedi kanı eter anestezisi altında kalpten alınırken, köpek kanı vena radialis (vena cephalica)'den alındı.

Kan örnekleri yaklaşık 30 dak. pıhtılaşmaya bırakıldı. Takiben, 2500 rpm de 15 dak. oda ısısında santrifüj edilerek serumlar ayrıldı ve aynı gün içinde analizleri yapıldı.

3.1.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Merck(Almanya) ve Sigma (A.B.D) firmalarından temin edildi.

3.1.2.1. Agaroz Jel Elektroferezinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agaroz, fat red 7B (Sudan Red 7B) Sigma'dan, metanol, etanol %95, asetik asit Merck'den, tris - barbitol tamponu pH.8.6 Sebia firmasından (Fransa) elde edildi.

3.1.2.2. Lipoprotein Presipitasyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fosfotungstik asit, dekstran sülfat (M.W.500.000), dekstran sülfat (M.W.15.000). polietilen glikol (M.W 8000), polietilen glikol (M.W. 15.000 - 20.000), disodyum EDTA, dializ torbaları (250-94) Sigma firmasından, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, NaCl, sodyum azid (NaN_3), NaOH, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ Merck firmasından ve heparin (Liquemine 25.000 IÜ/5mL) Roche firmasından temin edildi.

3.1.2.3. SDS-PAG Elektroferezinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Lauril sülfat (SDS), akrilamid, N, N'- metilen bisakrilamid, glisin, trizma base. sodyum bromfenol blue, 2- merkaptotanol, coomassie blue R-250 (brillant blue R). N,N,N',N'- tetra metil etilen diamin (TEMED), amonyum persulfate, protein

standartları : düşük moleküler ağırlıklı (M.W 6500-66.000), yüksek moleküler ağırlıklı (M.W 36.000-205.000) Sigma firmasından, metanol, asetik asit Merck firmasından sağlandı.

3.1.3. Kullanılan Teçhizatlar

Laboratuvar santrifüjü (Hettich D72), Hoefer jel elektroforez ünitesi (Hoefer SE 250 sistemi, Hoefer Scientific Instruments, A.B.D.) : 1-Mighty Small II 7cm Vertical Slab Gel ünitesi SE 250, 2- Mighty Small jel döküm bölmesi SE 245, 3- Cam ve alüminyum levha depolama ve yıkama ünitesi SE 100, 4-Güç ünitesi (500 Volt) PS 500XT, 5- Jel kurutucu SE 1200, manyetik karıştırıcı (Ikamag Rec-G), vorteks mikser (Vibrofix VF1 Electronic, VF1).

3.2.METOT

3.2.1. Lipoprotein Presipitasyon Metotları

Genel Prensip: Polianyonların, divalent katyonlarla lipoprotein presipitasyonunun spesifik mekanizmaları henüz kesin olarak kanıtlanmamıştır. Bununla birlikte muhtemelen, lipoproteinlerin apolipoproteinleri üstündeki pozitif yüklü guruplar ile polianyonlar üstündeki negatif yüklü guruplar arasındaki etkileşim önemlidir. Divalent metal iyonları, suda çözünmeyen komplekslerin oluşumunu kolaylaştırmak için lipoproteinler üstündeki negatif olarak yüklü guruplarla (fosfolipidler gibi) etkileşim gösterir (87). LDL üzerindeki yüzey yükleri; lizin, arginin, aspartik asit, glutamik asit, histidin ile fosfatidil serin, heksozaminler, serbest yağ asitleri ve sialik asitlerin polar gurupları tarafından oluşturulur (3).

3.2.1.1. *Heparin / MnCl₂.4H₂O (46mmol/L) ile Serum β + pre-β Lipoproteinlerinin Presipitasyonu*

Ayıraçların Hazırlanışı

1 M MnCl₂.4H₂O : 9.8955 g MnCl₂.4H₂O bir miktar distile suda çözülerek 50 ml'ye tamamlandı. 4 °C de 3 ay stabildir.

Heparin Solüsyonu (4000 U/mL) : 0.8 ml liquemine (25.000IU/5ml) 0.2 mL %0.9 NaCl ile sulandırılarak hazırlandı. Bu solüsyon 4 °C de bir hafta stabildir.

Lipoprotein Presipitasyonu

4ml serum konik tabanlı santrifüj tüpüne pipetlendi, ağzı kapatıldı ve 4 °C de 30 dak. bekletildi. 200 µL heparin solüsyonu ilave edildi ve vorteks mikserde yaklaşık 1 dak. karıştırıldı. 200 µL MnCl₂ ilave edildi ve tekrar vorteks mikserde iyice karıştırıldı. Tüpün ağzı kapatılıp 4 °C de 30 dak. bekletildi. 4500 rpm de 1.5 saat santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüm apo B içeren lipoproteinleri presipite etmek için bir gece buzdolabında bekletildi. Ertesi sabah 4500 rpm de 45 dak. santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı (63). 1 ml %0.9'luk NaCl ile presipitat dikkatlice yıkandı ve bir kurutma kağıdıyla NaCl uzaklaştırıldı. Presipitatlar 0.25 ml 0.5 M sodyum sitrat ve 1 ml 0.15 M NaCl'de çözüldü. NaCl'e ilaveten sodyum sitratın eklenmesi muhtemelen iyonik gücü arttırmakta ve daha iyi çözünürlüğü sağlamaktadır. Çözülen presipitat 1 gece +4°C'de NaCl/azid (8.77g NaCl, 0.13 g sodyum nitrit, 0.372 g Na₂EDTA 1 litreye tamamlandı pH7.3'e ayarlandı) solüsyonuna karşı diyaliz yapıldı. Böylelikle sodyum sitrat ve Mn⁺² çözünen presipitatdan uzaklaştırıldı (6).

3.2.1.2. Dekstran Sülfat / MgCl₂.6H₂O İle Serum β + pre-β Lipoproteinlerinin Presipitasyonu

Ayıracıların Hazırlanışı

% 10 Dekstran Sülfat (M.W. 15.000, dekstralip 15) : 0.5 g dekstran sülfat yaklaşık 3 ml 0.15 M NaCl içinde eritilerek aynı solüsyonla 5 mL'ye tamamlandı.

1 M MnCl₂.4H₂O

Lipoproteinlerin Presipitasyonu

4ml seruma %10 dekstran sülfattan 20 µL ilave edildi. İyice karıştırıldı. 1M MnCl₂.4H₂O dan 200 µL ilave edildi ve karıştırıldı. 4500 rpm de 45 dak. santrifüj edildi (15). Presipitatlar heparin/MnCl₂ metodundaki gibi hazırlandı (15).

3.2.1.3. Fosfotungstik asit / $MgCl_2$ İle Serum β + pre- β Lipoproteinlerinin Presipitasyonu

Ayıracıların Hazırlanışı

Na-Fosfotungstat Ayıracı (%4) : Yaklaşık 50 ml deiyonize suda 4 g fosfotungstik asit çözülerek, 16 ml 1 M NaOH ilave edildi. 1 M HCl ile pH'sı 7.4'e ayarlandı ve 100 ml'ye deiyonize su ile tamamlandı.

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (2M)

Kombine ayıraç: 20ml $MgCl_2$ ile 80 ml Na-fosfotungstat (1 kısım $MgCl_2$ / 4 kısım Na-fosfotungstat) karıştırılarak 100 ml'lik kombine ayıraç hazırlandı. +4 °C de saklandı.

Lipoprotein Presipitasyonu

200 μ L kombine ayıraç 2 ml seruma ilave edildi ve karıştırıldı. 5 dak. oda ısısında bekletildi ve 4500 rpm'de 36 dak. santrifüj edildi (88). Presipitat ve süpernatantlar ayrıldı. Presipitatlar, 240 mM Na_2CO_3 ve 150 mM NaCl karışımının 1 ml'sinde çözüldü (18).

3.2.1.4. Polietilen Glikol (8000) ile Serum β + pre- β Lipoproteinlerinin Presipitasyonu

Ayıracın hazırlanması

Polietilen Glikol (PEG) 8000 (%13) : 13 g PEG 8000 yaklaşık 50 ml distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

Lipoproteinlerin Presipitasyonu

2ml seruma 2 ml ayıraç eklendi. 15 dak. beklendi. 4500 rpm de 25 dak. santrifüj edildi. Presipitat ve süpernatantlar ayrıldı. Presipitatlar presipitasyon ayıracıyla yıkandı ve 1 ml %0.9 NaCl içinde çözüldü (20).

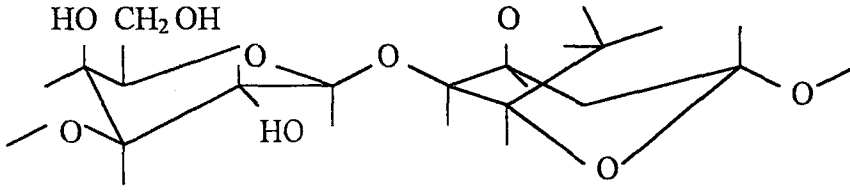
Tüm presipitasyon metotları insan serumuna uygulanarak, en etkin şekilde β + pre- β lipoproteinlerini çöktürenler elektroforetik olarak tespit edildi ve bu metotlar uygulandı. Daha sonra aynı metotlar sırasıyla, sığır, koyun, keçi, kedi, köpek, at, tavuk serumlarına uygulandı. Bu uygulama sırasında insan 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.

3.2.2. Agaroz Jel Elektroforez Metodu

Prensip

Deniz yosunundan ekstrakte edilen agaroz linear bir polimerdir. Temel yapısı aşağıdaki gibidir:



D-galaktoz

3,6-anhidröz L-galaktoz

Agaroz jeller, berrak, transparan bir solüsyon elde edilinceye kadar arzu edilen tamponda agarozun eritilmesiyle hazırlanır. Eriyen solüsyon kalıba dökülür ve katılaşması sağlanır. Agaroz konsantrasyonu ile orantılı bir yoğunlukta matriks şekillenir. Elektriksel bir alan jele uygulandığında, negatif yüklü proteinler anoda doğru göç eder. Migrasyonun hızı şu parametrelere bağlıdır:

1-Moleküler Büyüklük: Daha büyük moleküller, daha büyük sürtünme etkisi yüzünden çok daha yavaş göç ederler.

2-Agaroz konsantrasyonu: Agaroz konsantrasyonu arttıkça azalan gözenek boyutuna bağlı olarak migrasyon yavaşlar.

3-Uygulanan Voltaj: Agaroz jellerde separasyon aralığı voltaj arttığında azalır. Yani bantlar birbirine daha yakın göç eder.

4-Isı: Genelde agaroz jeller oda ısısında elektroforez yapılır. Bununla birlikte %0.5 den daha az agaroz içeren jeller ve düşük erime ısılı agaroz jeller oldukça dayanıksız olduğundan 4 °C de elektroforez işlemi uygulanır.

5-Elektroforetik Tamponun Kompozisyonu: Elektroforetik mobilite, elektroforez tamponunun kompozisyonu ve iyonik güce bağlıdır. İyonların yokluğunda elektriksel iletim minimaldir ve moleküller çok yavaş göç eder. Buffer yüksek iyonik güce sahipse,

elektriksel iletim çok etkilidir ve önemli ölçüde ısı oluşur. Bu durumda jel erir ve protein denatüre olur.

Elektroforez tamponları genellikle konsantre solüsyonlar olarak yapılır ve oda ısısında depolanır.

Agaroz jeller kırılmandır ve hidrokolloidlerdir. Zayıf hidrojen ve hidrofobik bağların formasyonu ile bir arada tutulurlar. Bu sebepten dolayı agaroz jeller özel itina gerektirmektedir (64, 73). Agaroz jel elektroforez geleneksel olarak horizontal ünitelerde uygulanır. Fakat vertical düzenekte yapılan agaroz jel elektroforezde düz bantlar görülür ve ilerlemesi kısmen daha az zaman alır.

Agaroz jel elektroforezi Hoefer SE 250 vertical jel elektroforez ünitesinde yapıldı. Geleneksel olarak horizontal yapılan agaroz jel elektroforezi bu sistem ile vertical olarak uygulandı ve metot buna göre modifiye edildi. Agaroz jel elektroforeziyle, presipitasyon prosedürleri neticesinde β + pre- β lipoproteinlerin ne derece çöktürüldüğü ve separe edildiği tespit edildi.

Jel döküm Ünitesinin Hazırlanışı

Aynı anda 2 jel hazırlamaya müsait jel döküm ünitesi 2 buzlu cam (10 x 8 cm) arasına her iki kısa kenar boyunca 1.5 mm kalınlığında plastik şeritler (spacers) yerleştirilerek hazırlandı. Ünite yaklaşık 30 dak. 45-50 °C lik etüvde bekletildi.

Jelin hazırlanışı

Barbital Tampon pH 8.6 (75ml stok): Konsantre 75 ml'lik stok tampon 1000ml'ye distile su ile tamamlandı. Sulandırılmış tampon 15-30 °C'de 2 ay saklanabilir. Tamponun bileşimi:

Tris	: 0.06 M
Barbital	: 0.01 M
Sodyum Barbital	: 0.05 M
Sodyum Azid	: 0.0015 M

%0.8'lik, 1.5mm kalınlığındaki 2 jel için 0.2gr agaroz 25 ml barbital tampona ilave edildi ve kaynatılarak agaroz eritildi. Eritilen agaroz 45-50 °C deki etüve konuldu ve 10-15 dakika bekletildi. Bir enjektör yardımıyla 45-50 °C ye soğutulmuş agaroz solüsyonu aynı ısıya getirilmiş 2 buzlu cam levha arasına döküldü ve 10 dişli 1.5 mm

kalınlığında taraklar yerleştirildi. Agaroz solüsyonunun jel haline gelmesi için en az 2 saat + 4 °C de bekletildi.

Elektroforezin Uygulanması

Jel oluşumundan sonra dikkatlice taraklar çıkarıldı, böylece numunelerin konulacağı 10 kuyucuk şekillendirildi ve jel elektroforez ünitesine yerleştirildi. Alt ve üst elektroforez tankları barbital tampon (pH 8.6) ile dolduruldu.

15 mA/jel de (sabit amperaj) yaklaşık 36 V'da 1 saat 30 dak. elektroforez işlemi sürdürüldü.

Örneklerin Hazırlanması ve Uygulanması

İnsan serumundan kuyucuklara direkt olarak 9µL ve diğer hayvan türlerinin serumlarından 15 µL ilave edildi.

Presipitatlar ve süpernatantlar ise kuyucuklara yerleştirilmeden önce örnek tamponuyla aşağıdaki gibi hazırlandı :

Örnek Tamponu :

16 ml barbital tampon (pH 8.6)

5 ml gliserol

0.1 ml %1 brom fenol blue

50 ml ye distile su ile tamamlandı.

100 µL presipitat ve 200 µL süpernatant için 50 µL örnek tampon solüsyonu ilave edildi.

Kuyucuklara insan serum lipoprotein presipitatlarından 15µL ve süpernatantlarından 20 µL, diğer hayvan türlerinin serum lipoprotein presipitat ve süpernatantlarından 40 µL kuyucuklara ilave edildi. Her jelin ilk kuyucuğuna insan serumu referans olarak uygulandı.

Boyama ve Fazla Boyadan Arındırma İşlemleri

Boyama: Elektroforez sonrası jeller, etanol / asetik asit / su 60:10:30 (v/v) karışımında 10 dak. fikze edildi. Fikzasyon sonrası 30 dak. 60 °C de kurutuldu. Kuruyan jeller Fat Red 7B boyasında boyandı:

Fat Red 7 B Stok

0.03375 g (5.literatür modifiye edildi.) Fat Red 7B 100 ml absolut metanol içinde manyetik karıştırıcıda en az 6 saat karıştırıldı. Bir gece bekletildi. Boya maksimum 2 ay oda ısısında dayanıklıdır (5).

Fat Red 7B Çalışma Boyası

Kullanmadan hemen önce hazırlanır.30 ml boya 6.6 ml distile su ile karıştırıldı ve jeller bunun içinde bir gece bekletildi (64).

Fazla Boyadan Arındırma: Boyama sonrası jeller fazla boyadan arındırıldı. Bu amaçla distile su / metanol (4 : 1, v/v) karışımı kullanıldı. Distile su / metanol karışımında jeller 1 gün bekletilebilir ve bu karışımında yaklaşık 1 hafta saklanabilir. Jellerin kurutulmasından ziyade bu şekilde saklanıp fotoğraflanması uygun görüldü.

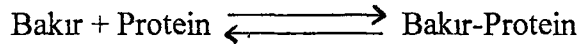
3.2.3 Protein Tayini

SDS-PAGE ile β + pre- β lipoproteinlerin apoprotein kompozisyonları belirlenmeden önce presipitatların (β + pre- β lipoproteinlerin) protein miktarları tespit edildi ve buna göre her jel kuyucuğuna ~30 μ g protein ilave edildi.

Lipoproteinlerin protein miktarı Lowry (58) yöntemine göre ölçüldü.

Prensip

Alkali bakır tartarat ayırıcı peptid bağları ile kompleks yapar.



Her 7 veya 8 amino asit artığı 1 atom bakır bağlar. Fenol ayırıcı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi renk şekillenir. Bu renk 650 nm'de okunur.

Protein konsantrasyonu ile oluşan renk arasında yüksek konsantrasyonlar için lineer bir ilişki olmadığından örnekler sulandırılarak ölçümler yapıldı.

Ayıraçlar

1-Alkali Bakır Ayırıcı : 10 g Na₂CO₃ , 0.1 g potasyum tartarat ve 0.05 g bakır sülfat, 0.5 N NaOH içinde çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı.Bu çözelti oda ısısında 30 gün dayanıklıdır.

2-Fenol Ayıracı: 2.0 N Folin-Ciocalteu-Fenol ayıracından 3.75 ml alındı, distile su ile 67.5 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti örnek sayısına göre çalışma anında günlük olarak hazırlanır.

3-Protein Standartı : 50 µg Sığır serum albumin (BSA) / ml

4-Okuma sınırlarına getirilmiş (sulandırılmış) örnek

Deneyin Yapılışı

	Kör		Standart
Örnek			
Alkali Bakır Ayıracı (ml)	1.0	1.0	
	1.0		
Protein Standartı (ml)	-	1.0	-
Örnek (ml)	-	-	
	1.0		
Distile su (ml)	1.0	-	-
Tüpler iyice karıştırıldı ve 10 dak. oda ısısında bekletildi.			
Fenol Ayıracı (ml)	4.0	4.0	
	4.0		

Tüpler vorteks mikserde iyice karıştırıldı ve 5 dak. 55 °C'de bekletildi. İnkübasyon sonrası musluk suyu altında soğutuldu. Daha sonra 650 nm'de standart ve örneklerin absorbansı kör'e karşı okundu.

Hesaplama

$$\mu\text{g protein / ml} = (\text{örnek Abs. / Std. Abs.}) \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

3.2.4. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroferez (SDS-PAGE)

Discontinuous SDS-PAGE, Laemli (53) metodu Hoefler SE 250 sistemine uyarlanarak gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroferez ile tespit edilen en ideal β + pre- β presipitasyonun gerçekleştiği (β + pre- β lipoproteinlerin çöktüğü, HDL'in hiç

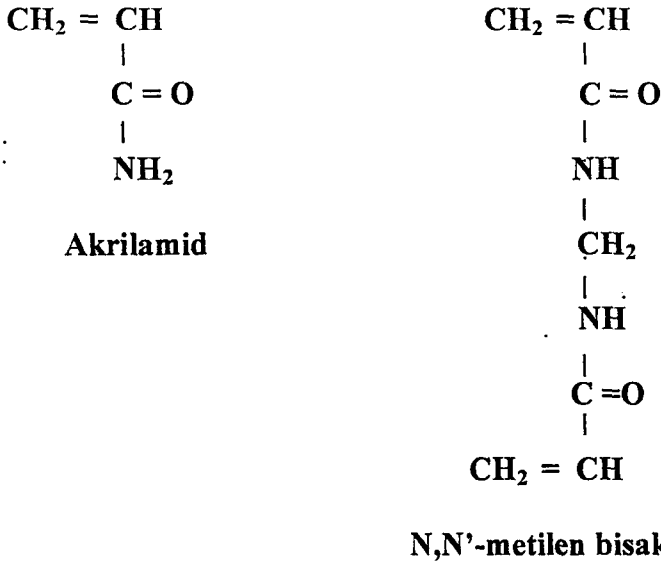
kopresipite olmadığı) numuneler SDS-PAGE analizine tabi tutuldu. Böylece agaroz jel elektroforezi ile separe edilen β + pre- β lipoproteinlerin apolipoprotein kompozisyonlarının belirlenmesi amaçlandı.

Prensip

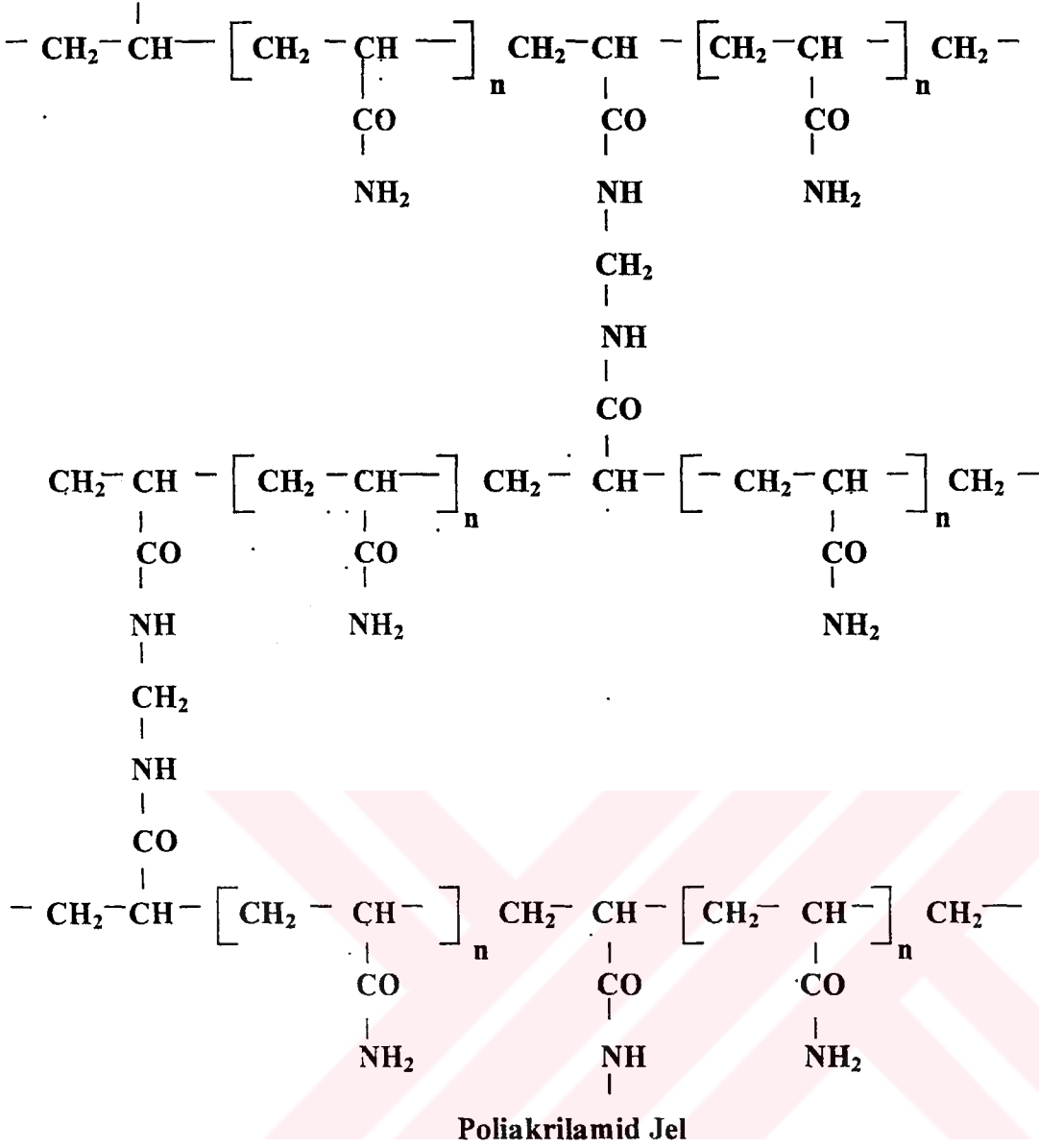
Poliakrilamid jel, akrilamid monomerinin, serbest fonksiyonel gruplarıyla reaksiyona giren N,N'-metilen bisakrilamid gibi bifonksiyonel bileşikler aracılığıyla karşılıklı bağlanarak polimerize olmasıyla şekillenir.

Akrilamidin polimerizasyonu, amonyum persülfat ilavesiyle başlatılır. N, N, N', N' tetrametiletildiamin (TEMED)'in ilavesiyle polimerizasyon oluşumu hızlandırılır. Amonyum persülfat - TEMED sisteminde TEMED persülfattan serbest radikallerin oluşumunu katalize eder ve oluşan serbest radikalleri polimerizasyonu başlatmaya yöneltir. TEMED yada amonyum persülfat konsantrasyonundaki artışlar polimerizasyonu artırır. Oksijen polimerizasyonu inhibe ettiği için jeller dökülmeden önce degaze edilir.

Poliakrilamid jellerdeki gözenek (por) boyutu total akrilamid konsantrasyonuna bağlıdır (%3.5-20).Düşük akrilamid konsantrasyonu büyük porlu, yüksek akrilamid konsantrasyonu küçük porlu jelleri oluşturur.Porlaşma poimerizasyon zincirinin uzunluğu ve karşılıklı bağlanmanın derecesiyle belirlenir. Karşılıklı bağlanmanın bir molü akrilamidin 29 monomerini içerir (şekil4a,4b).



Şekil 4a . Akrilamid ve N, N' – metilen bisakrilamid'in kimyasal yapısı



Şekil 4b . Poliakrilamid jelin kimyasal yapısı

Discontinuous sistemlerin avantajı, dilüe protein örneklerinin kısmen büyük hacimlerinin jellere uygulanabilir olması ve örnek içeriklerinin iyi rezolüsyonunun sağlanmasıdır.

Poliakrilamid jellerde çok yaygın olarak kullanılan çözücü ajan iyonik bir deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS)'dir. Protein karışımı, SDS ve 2-merkaptolanol varlığında ısıtıldığında proteinlerin disülfid bağları kırılarak denatüre edilirler. Bu şartlar altında, birçok polipeptid ağırlığına göre SDS'i bağlar (Proteinin her gramı 1.4gr SDS bağlar.) İndirgeyici ajanların varlığında proteinlere SDS'in bağlanmasının 2 önemi vardır: İlki proteinin natif yükünün tamamen yok olmasıdır. Böylelikle yük/kütle oranı

tüm proteinler için sabitlenir. İkinci olarak, negatif yüklü SDS molekülleri arasında elektrostatik geri itme, hem intramoleküler hem de intermoleküler tüm non-kovalent protein-protein ilişkilerini bozar. Böylelikle SDS'in proteine sabit bir yük/kütle oranına sahip değişmez bir yapı kazandırdığı farzedilebilir. Böylece SDS-polipeptid komplekslerin yük dansiteleri aynı olur ve polipeptid boyutuna göre poliakrilamid jelde göç ederler.

Proteinler, küçük porlu rezolving jelde elektroforezde separe olmadan önce büyük porlu stacking jel boyunca göç sırasında depolanır ve sıkıştırılırlar. Stacking jelde stoklanmış proteinler, rezolving jeldeki moleküler elek etkisine bağlı olarak, iç yük ve boyutlarına göre separe edilirler (39, 64).

Solüsyonların Hazırlanışı

Akrilamid Stok Solüsyonu (%30)

14.6 g akrilamid ve 0.4 g N,N'- metilen bisakrilamid 50 ml ye distile su ile tamamlandı. Süzgeç kağıdıyla süzüldü. Koyu renkli şişede +4 °C de 2 hafta dayanıklıdır.

Resolving Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCl, pH8.8)

18.15 g tris 60 ml suda eritildi ve 1 N HCl ile pH'sı 8.8'e ayarlandı. 100 ml'ye tamamlandı.+4 °C'de muhafaza edildi.

Stacking Jel Tamponu (0.5 M Tris-HCl, pH6.8)

6.1 g tris 75 ml distile suda eritildi, distile su ile 250 ml ye tamamlandı.pH 8.8'e ayarlandı.

Tris-Glisin Elektrod Buffer

1.515 g tris, 7.2 g glisin ve 0.25 g sodyum dodesil sülfat (SDS) distile suyla 500 ml ye tamamlandı (pH 8.3).

Örnek Tamponu

20 ml Distile su, 5 ml tris-HCl, pH6.8 (Stacking jel tamponu), 4 ml gliserol, 8 ml %10 SDS, 2 ml 2-β-merkaptolanol,1 ml % 0.05 bromfenol blue karıştırıldı. Koyu renkli şişede oda ısısında yaklaşık 3 ay muhafaza edilir.

%10 (w/v) SDS

10 g SDS distile suda hafifçe karıştırılarak çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı.

%10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS)

0.5g amonyum persülfat bir miktar distile suda çözülerek 5 ml'ye tamamlandı.

Kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanmalıdır.

Jel kompozisyonları aşağıdaki şekildedir :

Resolving Jel (%7.5)	Resolving Jel (%12)	Stacking Jel (%4)
4.85ml distile su	3.35 ml distile su	6.04 ml distile su
2.5mlTris/HCl, pH8.8	2.5 ml Tris/HCl, pH8.8	2.5 ml Tris-HCl pH6.8
100µL %10 SDS	100µL %10 SDS	100µL %10 SDS
2.5 ml Akrilamid stok	4 ml Akrilamid stok	1.3 ml Akrilamid stok

Degaze edilir,

35µL %10 APS	35µL %10 APS	35µL %10 APS
5µL TEMED	5µL TEMED	10µL TEMED

ilave edilir.

Boya Solüsyonu:

Coomassie Blue R-250	0.125g
Metanol	200 ml
Asetik asit	35 ml

Distile su ile 500 ml ye tamamlandı ve süzüldü. Jeller bu boya solüsyonunda en az 4 saat bekletildi.

Fazla Boyadan Arındırma Solüsyonu:

Metanol	400 ml
Asetik Asit	70 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Jeller bu solüsyon içinde 1 saat bekletildi ve daha sonra jeller %5 lik asetik asit içinde muhafaza edildi.

Elektroforezin Yapılışı

Cam ve alüminyum plaka, (10 x 8 cm) 1mm kalınlığındaki plastik şeritler (spacers) plakaların her iki kısa kenarı boyunca yerleştirilerek sandviç teşkil edecek şekilde biraraya getirildi. İlk önce resolving jel 10 ml'lik bir enjektör yardımıyla cam ve alüminyum plaka arasına hava kabarcığı kalmadan dolduruldu. Doldurma işlemine üst kenara 3 cm kalıncaya kadar devam edildi. Jelin dökülmesini takiben 1 ml'lik bir enjektör yardımıyla jel yüzeyi üzerinde distile suyla ince bir tabaka oluşturuldu. Böylelikle düz bir polimerizasyon hattı meydana getirildi. En az 1 saat polimerizasyon için bekletildikten sonra su süzgeç kağıdı ile alındı ve stacking jel hazırlanıp hava kabarcığı kalmaksızın yine bir enjektör yardımıyla döküldü. Hemen ardından 1 mm kalınlığındaki taraklar yerleştirildi ve polimerizasyon için en az 2 saat bekletildi. Süre sonunda taraklar çıkarıldı ve numunelerin tatbik edilecekleri 10 kuyucuk 3 kez, polimerizasyon artıklarını uzaklaştırmak amacıyla tris-glisin elektrot tamponu ile yıkandı. Yıkama sonrası kuyucuklar tampon ile dolduruldu ve numuneler kuyucuklara tatbik edildi.

Düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerin tek bir konsantrasyondaki jel üzerinde tespit edilme zorluğu sebebiyle seçilen presipitatlar ($\beta + \text{pre-}\beta$) hem %7.5 hem de %12'lik jellerde elektroforeze tabi tutuldu. Düşük konsantrasyonlu jel (%7.5) yüksek moleküler ağırlıklı apolipoproteinlerin, yüksek konsantrasyonlu jel (%12) ise düşük moleküler ağırlıklı apolipoproteinlerin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. %7.5 jellerde yüksek moleküler ağırlıklı protein standartları, %12 jellerde düşük moleküler ağırlıklı protein standartları kullanıldı.

Presipitatların Hazırlanışı

Agaroz jel elektroforez sonrası en iyi $\beta + \text{pre-}\beta$ çöktürmeyi sağlayan konsantrasyondaki -20°C de dondurulmuş olan presipitatlar kullanıldı.

Öncelikle her kuyucuğa ne kadar protein ilave edileceğini tespit etmek amacıyla Lowry yöntemiyle (58) protein tayini yapıldı. Uygulanan presipitat miktarı protein tayini yapıldıktan sonra belirlendi. Kuyucuklara mümkün olduğunca eşit miktarda protein konulması amacıyla hayvan türlerine göre konulan presipitat hacmi değişti.

İlgili presipitatlar örnek tamponu ile uygun dilüsyonu sağlayacak şekilde sulandırıldı ve 2-3 dak. kaynayan suda bekletildi. Her 4 lipoprotein presipitasyon prosedürü için, insan ve 7 hayvan türü için agaroz jel elektroforezle tespit edilen en

etkili β + pre- β çöktürmeyi sağlayan konsantrasyonlardaki presipitatlar, düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı protein standartları kuyucuklara ilave edildi.

Düşük ve Yüksek Moleküler Ağırlıklı Standartların Hazırlanışı

İçeriği : Her vial 100 μ L deiyonize su ile sulandırıldıktan sonra, yaklaşık 2-3.5 mg protein/ml, 62 mM tris (pH 8.0), 1mM EDTA, %3 sükröz, %0.5 dithiothreitol ve %0.005 bromfenol blue içerir (Tablo 10).

Hazırlanışı : Standart 10 μ L'lik porsiyonlara bölündü ve eşit hacimde (10 μ L) örnek tamponu ilave edildi, -20 °C'de depolandı. Elektroforez öncesi örneklerle beraber 2-3 dak. kaynayan suda bekletildi.

Uygulanışı : Örnek kuyucuklarına 7.5-10 μ L ilave edildi. 20mA/jel sabit akımında yaklaşık 75 dakika elektroforez yapıldı. Elektroforez sonrası jeller Coomassie Blue R-250 boya solüsyonunda boyandı. Fazla boyadan arındırıldı ve fotoğrafları çekildi.

Tablo 10. Protein Standartlarındaki Moleküler Ağırlık Dağılımları

PROTEİNLER	Moleküler Ağırlık	Yüksek Mol.Ağır.	Düşük Mol.Ağır.
MİYOZİN	205.000	X	
β -GALAKTOZİDAZ	116.000	X	
FOSFORİLAZ b	97.000	X	
FRUKTOZ-6-FOSFAT KİNAZ	84.000	X	
ALBÜMİN	66.000	X	X
GLUTAMAT DEHİDROGENAZ	55.000	X	
OVALBÜMİN	45.000	X	X
GLİSERALDEHİD-3-FOSFAT DEHİDROGENAZ	36.000	X	X
KARBONİK ANHİDRAZ	29.000		X
TRİPSİNOJEN	24.000		X
TRİPSİN İNHİBİTÖR	20.000		X
α -LAKTALBÜMİN	14.200		X
APROTİNİN	6.500		X

4. BULGULAR

4.1. DENEMELER

İnsan ve çeşitli hayvan türlerinin serum lipoproteinlerinin farklı presipitasyon metotları ile separasyonlarına geçmeden önce geleneksel olarak horizontal yapılan agaroz jel elektroforezi laboratuvarımızda mevcut olan vertikal slab jel sisteme uyarlandı. Presipitasyon sonrası separasyonun ne derece etkin olduğu agaroz jel elektroforezi ile tespit edileceği için, agaroz jel elektroforez çalışmanın ilerleyen basamakları için temel teşkil etmektedir. Bu amaçla, elektroforezde optimum bir separasyonun elde edilebilmesi için, jel konsantrasyonu ve kalınlığı, jele uygulanan akım ve elektroforez süresinin tespiti amacıyla çeşitli denemeler yapıldı.

4.1.1. Vertikal Slab Jel Düzeneginin Agaroz jel Elektroforez İçin Adaptasyonu

Agaroz jel elektroforezde ilk karşılaşılan zorluk jelin vertikal düzeneğe yerleştirilmesinde yaşandı. SE 250 vertikal slab jel düzenegi (Hofer Scientific Instruments) orijinal olarak 1 düz cam ve 1 buzlu cam şeklinde dizayn edilmişti. Agaroz jelin akışkan olması ve düz cam yüzeye tutunamaması yüzünden böyle bir düzenek tasarlanmıştı. Belirtilen düzeneğe sıcak agaroz solüsyonu döküldü ve donduruldu. Fakat jele yerleştirilen tarakların çıkarılması esnasında çok kırılmalı olan jelin kuyucuklarında yer yer kırılmalar şekillendi ve elektroforez esnasında üst tampon tankından alta doğru, jel ile cam plaka arasında önemli ölçüde bir sızma problemi yaşandı. Kuyucuklardaki kırılmaya bağlı sızma haricinde jelin tümüne dağılan bir sızma söz konusuydu. Bu da üst tampon seviyesinin azalmasıyla anlaşıldı. Sızma probleminin agaroz jelin düz cam yüzeye yeterince sıkı tutunamamasından kaynaklandığı düşünülerek düzenegin 1 düz 1 buzlu cam yerine 2 buzlu camdan oluşturulmasına karar verildi. Bu şekilde dökülen jellerde yine bazı kuyucuklarda kırılma gözlemlense de genel sızdırma problemi halledildi. Fakat sistemin orijinal ince camlarında, jel dökümü esnasında 45-50 °C ye kadar ısıtılması, aynı ısıdaki jelin dökümü ve soğutulması sırasında, özellikle soğuk kış günlerinde çatlaklar oluştu. Orijinal camlar düzeneğe uygun daha kalın buzlu camlar ile değiştirilerek düzenek ile ilgili mevcut problemler ortadan kaldırıldı.

4.1.2 Optimum Agaroz Jel Elektroferez Şartlarının Belirlenmesi

İnsan serum lipoproteinlerinin elektroforetik olarak keskin ve iyi separe olmuş bantlar halinde ayrılması için jel konsantrasyonu ve elektriksel akım üzerinde denemeler yapıldı. Mevcut literatürlerde horizontal agaroz jel elektroferezde düzeneğin yatay ve jelin kalın olmasından dolayı uygulanan akım da fazlaydı. Mevcut vertikal slab jel sistemde jelin kalınlığı en fazla 1.5 mm olduğu için, deneme yanılma yöntemiyle en düzgün bantları verecek akım belirlendi. Elektroferez süresi de akıma ve göçe göre ayarlandı.

1.5 mm kalınlığındaki jelle 12, 15, 20, 25 mA akım (sabit amperaj) uygulandı. Elektroferez süresi bantların migrasyon oranları takip edilerek 1 saat ile 2 saat arasındaki sürelerde denendi. Çeşitli kombinasyonlardan sonra 15 mA / jel sabit amperajda ~ 40V da 1 saat 30 dak. elektroferez iyi bir separasyon sağladı.

1- %0.5-%1 arasındaki jel konsantrasyonları denendi. %0.5 lik jel çok kırılğan olduğundan %0.6, %0.7, %0.8, %0.9 ve % 1 lik jellerde insan serum ve plazmasının separasyonu yapıldı (Şekil 5, 6, 7, 8, 9).

2-Numune kuyucuklarına ilave edilecek serum miktarının da separasyonu etkilediği gözlemlendi. İnsan serumundan kuyucuklara 5 µL ilave edildi. Bantların daha fazla belirgin olması amacıyla miktar 9 µL'ye çıkarıldı.

Yapılan tüm adaptasyon çalışmalarından sonra, % 0.8'lik, 1.5 mm kalınlığındaki jelde 15 mA de 1saat 30 dak. süreyle tris-barbital pH 8.6 tampon ile en iyi elektroforetik separasyon gerçekleştirildi (Şekil10). İnsan serumunun separasyonu için adapte edilen agaroz jel elektroferez şartlarında, presipitasyon prosedürü öncesi sırasıyla tüm hayvan türlerinin (sığır, koyun, keçi, kedi, köpek, at, tavuk) serum lipoproteinlerinin separasyonları da gerçekleştirildi (Şekil 16, 22, 28, 34, 40, 45, 50).

4.1.3.Serum β + pre- β Lipoproteinlerinin Presipitasyonla Separasyon Denemeleri

Serum lipoproteinlerinin polianyon-divalent katyon presipitasyonu ile separasyonlarında seruma artan konsantrasyonlarda polianyon-divalent katyon ayıraçlarının (x0.5, x1, x2, x3) eklenmesi sonucunda süpernatantta α lipoproteinlerin konsantrasyonlarının giderek azalmasına karşılık presipitatda β + pre- β bandına ilaveten α lipoprotein fraksiyonu agaroz jel elektroferez ile tespit edilemedi. Bunun yerine tek bir lipoprotein bandı gözlemlendi. Böylelikle presipitatda β + pre- β ve α lipoproteinler

ile polianyon-divalent katyonların bir kompleks teşkil ettiği, presipitatın çözünmesi sırasında bu kompleksin yeterince çözünmediği, bu nedenle elektroforetik separasyonda lipoprotein fraksiyonlarının tek bir bant şeklinde görüldüğü, lipoproteinlerin jele giremeyip orjinde biriktiği ve çok az ilerlediği belirlendi. Bu nedenle polianyon-divalent katyon kompleksinin dissosiasyonunu sağlamak için heparin ve dekstran sülfat presipitasyon metodunda presipitatların çözünmesinde orijinal metotda (63) kullanılan %0.9 NaCl yerine, sodyum sitrat ve %0.9 NaCl (6) kullanılarak muhtemelen iyonik gücün artırılmasıyla lipoprotein-polianyon/divalent katyon kompleksinin dissosiasyonu sağlandı. Sodyum fosfotungstat metodunda bu kompleksin ayrışımı için sodyum karbonat ve %0.9 NaCl (18), polietilen glikol metodunda ise sadece %0.9 NaCl kullanıldı. PEG metodu ile elde edilen presipitatların dissosiasyonunda diğer metotlarda olduğu kadar başarılı olunamadı. Presipitasyon metotlarında, presipitatlardaki dissosiasyon probleminin halledilmesinden sonraki çalışmaların fotoğrafları sunuldu.

4.2.SERUM LİPOPROTEİNLERİNİN PRESİPİTASYON METOTLARIYLA SEPARASYONLARININ AGARUZ JEL ELEKTROFOREZ SONUÇLARI

4.2.1.Heparin/MnCl₂ Presipitasyonu ile Serum Lipoproteinlerinin Separasyonları

Heparin/MnCl₂ ile, insan serum β + pre- β lipoproteinlerinin separasyonu için metotda belirtilen ayıraçların konsantrasyonları sırasıyla x0.5, x1, x2, x3 kat artırıldı. Bu prosedür insan ve diğer hayvan türleri için aynen uygulandı.

4.2.1.1. İnsan Lipoproteinleri

x0.5, x1, x2, x3 konsantrasyonlarında eklenen heparin/MnCl₂ ayırıcı sonrası elde edilen presipitatlar ve süpernatantların elektroforetik analizleri yapıldı. x0.5, x1, x2, x3 presipitatların elektroforetik analizinde presipite olan lipoprotein konsantrasyonunda artan ayıraç konsantrasyonuyla birlikte az belirgin bir artış gözlemlendi. β / pre- β ayırımı normal serumda bariz iken presipitatda bu ayırım yapılamadı. Süpernatantların elektroforetik analizinde ise x0.5 konsantrasyonda α lipoproteinden başka β + pre- β bandı da görüldü. x1, x2, x3 süpernatantlarda ise sadece sırasıyla azalan yoğunlukta bir α bandı belirlendi. Buna göre halihazırda mevcut literatürde (63) belirtilen

miktarlarda (x1) heparin/MnCl₂ ayırıcı, insan serum β + pre- β lipoproteinlerinin presipitasyonu için yeterli bulundu (Şekil 11).

4.2.1.2. Sığır Lipoproteinleri

İnsanlarda uygulanan heparin/MnCl₂ prosedürünün aynısı sığır serumu için de uygulandı. x0.5 presipitat'da ne β + pre- β , ne de α bandı mevcut değilken, x1'de çok az, x3'de ise β + pre- β ve α bandı görülmektedir. İnsan serumuna ilave edilen ayırıcının 2 katının ilavesi (x2) sığır serum β + pre- β lipoproteinlerinin presipitasyonu için yeterli olduğu görülmektedir. β /pre- β ayırımı hem serumda hem de presipitatda yapılamadı. Süpernatantlarda artan heparin/MnCl₂ ayıraç konsantrasyonuna bağlı olarak gittikçe azalan α bandı gözlemlendi (Şekil 17).

4.2.1.3. Koyun Lipoproteinleri

Koyun serum lipoproteinlerinin x0.5 presipitasyonunda, β + pre- β lipoproteinler çökmezken, süpernatantda hem α , hem de β + pre- β bandı görülmektedir. x1 de az bir β + pre- β bandı mevcutken, x2 ve x3 de giderek artan bir β + pre- β bandı göze çarpmaktadır. Süpernatantlarda ise x2 ve x3'ün süpernatantı arasında pek bir fark görülememesine rağmen x1 konsantrasyonun yeterli olduğu tespit edildi. β / pre- β ayırımı hem serumda hem de presipitat'da mümkün olmadı (Şekil 23).

4.2.1.4. Keçi Lipoproteinleri

Koyunda olduğu gibi x0.5'de β + pre- β çökmezken, x1 den x3'e doğru aratan bir β + pre- β bandı görülmektedir. Süpernatantlarda x1'deki presipitasyonun β + pre- β 'yi çöktürmede yeterli olduğu sonucuna varıldı. Keçi'de de β + pre- β ayırımı yapılamadı. (Şekil 29).

4.2.1.5. Kedi Lipoproteinleri

Şekil 35'de kedi serumunda şilomikronlar numune aplikasyon noktalarında görülmektedir. x0.5 presipitatta herhangi bir bant görülmedi. x1 ve x2 ayıraç konsantrasyonunda β + pre- β yaklaşık aynı oranda presipite olurken, x3 presipitatda α bandının da mevcut olduğu belirlendi. Süpernatantlarda x0.5'de hem β + pre- β hem de α bandı mevcutken, x1 den x3'e doğru sadece giderek azalan α bandı görülmektedir. Buna göre x1 presipitasyonun kedi serum lipoproteinlerini presipite ettiği tespit edildi.

4.2.1.6. Köpek Lipoproteinleri

Şekil 41'de x0.5 konsantrasyonda ayıraç eklenen serum presipitatlarında x1, x2 ve x3'e göre az da olsa β + pre- β lipoproteinler görülmektedir. x1, x2 ve x3 presipitatlarda çok belirgin bir fark görülememesine rağmen süpernatantlarda α bandın x0.5'den x3'e doğru azaldığı tespit edildi. x1 konsantrasyonda presipitatlarda sadece β + pre- β lipoproteinleri görülürken, süpernatantlarda sadece α lipoproteinler tespit edildi. x1 konsantrasyonu köpek β + pre- β lipoproteinlerinin presipitasyonu için yeterli bulundu.

4.2.1.7. At Lipoproteinleri

x0.5 presipitatın elektroforetogramında çok az da olsa bir β + pre- β bant mevcutken, x1, x2, x3 presipitatlardaki β + pre- β bandın yoğunluğu hafif bir artış gösterdi. Süpernatantlarda x0.5'den x3'e doğru α bandının yoğunluğu azaldı. x1 konsantrasyonda presipitatda sadece β + pre- β bandı belirlenirken, süpernatantda yoğun bir α bandı gözlemlendi. x1 konsantrasyon at serum β + pre- β lipoproteinlerinin presipitasyonu için yeterli bulundu (Şekil 46).

4.2.1.8. Tavuk Lipoproteinleri

Şekil 51'de görüldüğü gibi x0.5, x1, x2 ve x3 presipitatların elektroforetogramları arasında yoğunluk açısından belirgin bir fark görülmedi. Süpernatantlarda giderek azalan α bandı tespit edildi. x0.5'in süpernatantında bile β + pre- β bandı mevcut değildi. Tavukta x0.5 konsantrasyondaki heparin ayırıcı dahi serum β + pre- β lipoproteinleri çöktürmede yeterli bulundu.

4.2.2. Dekstran Sülfat / $MnCl_2$ Presipitasyonu ile Serum Lipoproteinlerinin Separasyonu

4.2.2.1. İnsan Lipoproteinleri

İnsan serumunun dekstran sülfat/ $MnCl_2$ ile yapılan presipitasyonunda artan ayıraç konsantrasyonuna bağlı olarak presipitatda β + pre- β bandın yoğunluğunun gittikçe arttığı gözlemlendi (şekil 12). Buna karşın süpernatantda α lipoprotein konsantrasyonu azaldı. x0.5 konsantrasyondaki presipitatda sadece β + pre- β mevcutken, süpernatantda α bandına ilave olarak belirgin bir β + pre- β bandı görülmektedir. Bu da x0.5 konsantrasyondaki ayırıcın β + pre- β lipoproteinlerin tam olarak presipitasyonunu

sağlayamadığını göstermektedir. x2 ve x3 presipitatlarda çok az da olsa bir α bandının mevcudiyeti, kullanılan yöntem ile insan $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinlerin presipitasyonunun tam olarak sağlandığı doğrulanmaktadır. Heparinden farklı olarak presipitatlarda β ve $\text{pre-}\beta$ bant' da tam olmasa da bir ayırım gözlemlendi.

4.2.2.2. Sığır Lipoproteinleri

Sığır dekstran sülfat/ MnCl_2 ile yapılan presipitasyonda agaroz jelde x1, x2, x3 konsantrasyondaki presipitat ve süpernatantlar analiz edildi. x1 konsantrasyonda sadece $\beta + \text{pre-}\beta$ bandı mevcut iken, x2 ve x3 presipitatların elektroforetogramlarında $\beta + \text{pre-}\beta$ bandına ilave olarak α bandı da görüldü. Süpernatantlarda ise buna bağlı olarak α bandında azalma gözlemlendi. Böylelikle insanlarda etkili olan ayıraç konsantrasyonunun (x1) sığır serum $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinlerini tam olarak presipite etmede etkili olduğu belirlendi (Şekil 18).

4.2.2.3. Koyun Lipoproteinleri

x0.5 konsantrasyondaki presipitatda $\beta + \text{pre-}\beta$ bandı mevcut değilken, süpernatantta $\beta + \text{pre-}\beta$ ve α lipoproteinler görüldü. x1, x2, x3 konsantrasyondaki presipitatların elektroforetik analizlerinde $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoprotein bantlarının yoğunluğu az da olsa artarken, süpernatantlarda sırasıyla α bandının konsantrasyonunda azalma tespit edildi. x1 konsantrasyonun koyun serum $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinlerini tam olarak presipite ettiği tespit edildi (Şekil 24).

4.2.2.4. Keçi Lipoproteinleri

Keçi serumunda dekstran sülfat/ MnCl_2 ile yapılan presipitasyonda x0.5 konsantrasyondaki presipitatda silik bir $\beta + \text{pre-}\beta$ bandı mevcutken. aynı konsantrasyondaki süpernatantta $\beta + \text{pre-}\beta$ ve α bantları belirlendi. x1 ve x2 presipitatlarda yoğun boyanan $\beta + \text{pre-}\beta$ bantları görülürken, aynı konsantrasyondaki presipitatlarda α bandı da görüldü. Buna göre keçi $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinlerinin tam presipitasyonunun x1 konsantrasyon ile sağlandığı belirlendi (Şekil 30).

4.2.2.5. Kedi lipoproteinleri

x0.5 presipitatda $\beta + \text{pre-}\beta$ bandı mevcut değilken, süpernatantta $\beta + \text{pre-}\beta$ ve α bandının her ikisi de bulundu. x2 ve x3 presipitatlarda α lipoproteinler de görülürken

süpernatantlarda giderek azalan α bandının varlığı, x2 ve x3 presipitatlara α lipoproteinlerin de dahil olduğunu göstermektedir. Kedi'de de dekstran sülfat/MnCl₂ ile presipitasyonda insanlar için elverişli konsantrasyonun (x1) β + pre- β lipoproteinler için etkili bir presipitasyon sağladığı gözlemlendi (Şekil 36).

4.2.2.6. Köpek Lipoproteinleri

Köpeklerde dekstran sülfat ile yapılan presipitasyonda, heparin ile olduğu gibi x0.5 konsantrasyonda β + pre- β lipoproteinleri tespit edildi. Aynı konsantrasyonun süpernatantına bakıldığında yaygın ve koyu boyanan bir α bandı görüldü. x2 presipitatda çok az belirgin ve x3 presipitatda ise belirgin bir α bandı göze çarptı. Süpernatantlarda azalan α bandı da bunu doğruladı. Buna göre köpeklerde de insanlarda kullanılan ayıraç konsantrasyonunun (x1) elverişli olduğu görüldü (Şekil 42).

4.2.2.7. At lipoproteinleri

Şekil 47'de görüldüğü üzere x0.5 konsantrasyondaki presipitatda β + pre- β bandı bulunmazken süpernatantda yaygın halde β + pre- β ve α bandı görüldü. x1 ve x2 presipitatların elektroforetogramlarında x2 konsantrasyonda çok az olmak üzere x3 presipitatda β + pre- β bandına ilave olarak α bandı da tespit edildi. Süpernatantlara bakıldığında, x1 den x3'e doğru α bandında gözle görülür bir azalış gözlemlendi. Atlarda da insan ve diğer türlerde olduğu gibi x1 presipitasyonun β + pre- β lipoproteinleri α lipoproteinler ile kontaminasyonsuz bir şekilde presipite ettiği belirlendi.

4.2.2.8. Tavuk Lipoproteinleri

Şekil 52'de x0.5 presipitatda her ne kadar β + pre- β bandı mevcutsa da x1'e göre daha az yoğun olduğu görüldü. x2 presipitatda çok az, x3'de ise oldukça belirgin bir α bandı gözlemlendi. x0.5'in süpernatantında β + pre- β bandın bulunmaması ve α bandının mevcut olmasına rağmen, x1 presipitatdaki β + pre- β bandın daha yoğun olması ve süpernatantda β + pre- β bandının bulunmaması nedeniyle, x1 konsantrasyonun etkili bir β + pre- β presipitasyonu sağladığı belirlendi.

4.2.3. Sodyum Fosfotungstat / $MgCl_2$ Presipitasyonu ile Serum Lipoproteinlerinin Separasyonu

4.2.3.1. İnsan Lipoproteinleri

x1, x2, x3 konsantrasyonlarında ayıraç kullanılarak yapılan insan serum $\beta + pre-\beta$ lipoproteinlerinin presipitasyonunda, presipitatların elektroforetogramlarında x1 ve x2 konsantrasyonlardaki presipitatlarda yalnızca $\beta + pre-\beta$ bantları gözlemlenirken, x3 presipitatda $\beta + pre-\beta$ bandı haricinde α lipoprotein bandı da görüldü. Süpernatantların elektroforetik analizinde x1'den x3'e doğru azalan yoğunlukta bir α bandı tespit edildi. İlgili metotdaki ayıracın sadece $\beta + pre-\beta$ lipoproteinleri çöktürdüğü doğrulandı (Şekil 13, 14).

4.2.3.2. Sığır Lipoproteinleri

x1, x2, x3 presipitatların elektroforetogramlarında; x1'de çok az belirgin bir $\beta + pre-\beta$ bandı varken, x2 ve x3'de çok yoğun bir $\beta + pre-\beta$ bandı yanında α bandı da tespit edildi. Süpernatantlara bakıldığında da presipitatlardaki görünümü destekleyecek şekilde x1'den x3'e doğru giderek azalan bir α bandı görüldü (Şekil 19, 20). Böylelikle sığır serum $\beta - pre-\beta$ lipoproteinlerinin x1 ayıraç konsantrasyonunda tamamen presipite edildiğine karar verildi.

4.2.3.3. Koyun Lipoproteinleri

Koyun $\beta + pre-\beta$ lipoproteinlerinin x1, x2, x3 konsantrasyonlarda presipitasyonunda, x1'de çok az belirgin bir $\beta + pre-\beta$ band görüldü. x3'de $\beta + pre-\beta$ bandından başka α bandı da tespit edildi. x2 konsantrasyon, α lipoproteinleri çöktürmeksizin maksimum yoğunlukta $\beta + pre-\beta$ lipoproteinleri çöktürmesi sebebiyle en etkili konsantrasyon olarak seçildi (Şekil 25, 26).

4.2.3.4. Keçi Lipoproteinleri

x1 presipitatda silik bir $\beta + pre-\beta$ bandı varken, x2'de bu bant daha fazla, x3'de ise $\beta + pre-\beta$ bandına ilaveten α bandı da göze çarptı. Süpernatantlara bakıldığında x1'den x3'e doğru giderek azalan yoğunlukta α bandı görüldü. Keçi serum $\beta + pre-\beta$ lipoproteinlerin tam presipitasyonunda x2 konsantrasyonun daha etkili olduğu tespit edildi (Şekil 31, 32).

4.2.3.5. Kedi Lipoproteinleri

x1, x2, x3 presipitatlarında giderek artan yoğunlukta $\beta + \text{pre-}\beta$ bandı görüldü. x2 ve x3'de buna ilaveten giderek artan α bandı da tespit edildi. Kedi serumunda fazlaca bulunan şilomikronlar numune aplikasyon noktalarında gözlemlendi. Muhtemelen bu nedenle bantlar keskin değildi ve arkalarında iz bırakarak göç ettiler. Süpernatantlarda artan ayıraç konsantrasyonuna bağlı olarak azalan α bandı da x1 presipitasyonun kediler için etkili olduğunu doğruladı (Şekil 37, 38).

4.2.3.6. Köpek Lipoproteinleri

Köpekte, x0.5, x1, x2, x3 ayıraç konsantrasyonlarında presipitasyon denendi; presipitat ve süpernatantlar aynı jelde gösterildi (Şekil 43). x0.5 presipitatda da az miktarda $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinleri görüldü. x2 ve x3 presipitatlarda α bandı da tespit edildi. Buna göre x1 konsantrasyon köpek lipoproteinlerini α lipoproteinler ile kontaminasyonsuz şekilde presipite etti. Süpernatantlarda α bandının azaldığı hatta x2 ve x3 de tamamen kaybolduğu görüldü.

4.2.3.7. At Lipoproteinleri

x0.5, x1, x2, x3 presipitatlarında x0.5'den x2'ye doğru artan yoğunlukta $\beta + \text{pre-}\beta$ bandı dikkat çekti. x3'de ise, $\beta + \text{pre-}\beta$ ile birlikte bir α bandının varlığı da görüldü. Süpernatantlarda x0.5'den x3'e doğru α bandında bir azalma mevcuttu; fakat bu azalma sadece x3'de daha belirgindi. At $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinleri bu elektroforetik analize göre x1'de tamamen presipite oldu (Şekil 48).

4.2.3.8. Tavuk Lipoproteinleri

x1 ayıraç konsantrasyonunda presipitatda sadece $\beta + \text{pre-}\beta$ bandı mevcutken x2 ve x3 konsantrasyonlarında buna ilaveten artan yoğunlukta α bantları da görüldü. Süpernatantlarda artan ayıraç konsantrasyonu ile birlikte azalan α bant yoğunluğu bu sonucu doğruladı. Bu sonuca göre x1 presipitasyonun etkili olduğu belirlendi (Şekil 53, 54).

4.2.4. Polietilen Glikol Presipitasyonu ile Serum Lipoproteinlerinin Separasyonu

4.2.4.1. İnsan Lipoproteinleri

x0.5 konsantrasyonda presipitatda silik bir $\beta + \text{pre-}\beta$ bandı mevcutken, süpernatantta $\beta + \text{pre-}\beta$ ve α bantları belirgin bir şekilde görüldü. Artan ayıraç konsantrasyonuna rağmen x3 presipitatlarda α lipoproteinler tespit edilemedi. İnsanda polietilen glikol ile yapılan presipitasyonda β ve $\text{pre-}\beta$ ayırımı çok net görüldü. Buna göre kullanılan polietilen presipitasyon metodu insan serum $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinlerini tam olarak presipite etmede elverişli bulundu (Şekil 15).

4.2.4.2. Sığır Lipoproteinleri

x0.5, x1, x2, x3 konsantrasyonda presipitasyon denendi. x0.5'de $\beta + \text{pre-}\beta$ bandı mevcut değilken, x1, x2, x3 presipitatların elektroforetogramları arasında $\beta + \text{pre-}\beta$ yoğunluğu bakımından pek bir fark görülemedi, fakat ayıraç konsantrasyonundaki artışa ve süpernatantdaki α lipoprotein yoğunluğundaki azalışa rağmen, presipitatlarda α bandının göç bölgesinde bir α bandı gözlenemedi. İnsanda olduğu gibi sığırdaki da x1 konsantrasyon presipitasyon için elverişli bulundu (Şekil 21).

4.2.4.3. Koyun Lipoproteinleri

x0.5 presipitatda $\beta + \text{pre-}\beta$ bandı mevcutken, süpernatantta sadece yoğun α bandı belirlendi. x1, x2 ve x3 presipitatlar arasında $\beta + \text{pre-}\beta$ band yoğunluğu bakımından fark görülemedi. Süpernatantlarda giderek azalan bir α bandı tespit edildi. Oysa bu azalışın karşılığında presipitatlarda bir α bant görülemedi. Koyun için de x1 konsantrasyonun etkili presipitasyonu sağladığı kabul edildi (Şekil 27).

4.2.4.4. Keçi Lipoproteinleri

x0.5'de silik bir $\beta + \text{pre-}\beta$ bandı varken, x1, x2, x3 presipitasyonların elektroforetogramlarında $\beta + \text{pre-}\beta$ bandı gittikçe yoğunlaştı. Süpernatantlarda x0.5'den x3'e doğru azalan α bandı görüldü. Oysa bu azalışın karşılığında presipitatlarda bir α bant tespit edilemedi. Aynı şekilde x1 konsantrasyonun etkili presipitasyon sağladığı belirlendi (Şekil 33).

4.2.4.5. Kedi Lipoproteinleri

x0.5'de tespit edilen $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoprotein yoğunluğu x3'e doğru artış gösterdi. Süpernatantlarda da x0.5'den x3'e doğru azalan α band görüldü. Oysa bu azalışın karşılığında presipitatlarda bir α bant tespit edilemedi. Bu kompozisyona göre x1 presipitasyon tercih edildi (Şekil 39).

4.2.4.6. Köpek Lipoproteinleri

x0.5 presipitatda silik bir $\beta + \text{pre-}\beta$ bant gözlemlendi. x1, x2, x3 arasında $\beta + \text{pre-}\beta$ bant yoğunluğu açısından fark gözlenmediğinden x1 tercih edildi. Süpernatantlarda x0.5, x1, x2, x3'e doğru giderek azalan bir α bandı mevcutken presipitatlarda α bandı gözlenemedi (Şekil 44).

4.2.4.7. At Lipoproteinleri

x0.5 presipitatda diğerleri kadar belirgin olmayan bir $\beta + \text{pre-}\beta$ bandı tespit edildi. x1, x2, x3 presipitatlarda gözle farkedilmeyen ve aynı gibi görünen $\beta + \text{pre-}\beta$ bandı gözlemlendi. Süpernatantlarda da α bandının yoğunluğu x0.5'den x3'e doğru azaldı. Süpernatantda α bandının azalışına karşın presipitatda α bandı tespit edilemedi. x1 ayıraç konsantrasyonun $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinleri presipite ettiği kabul edildi (Şekil 49).

4.2.4.8. Tavuk Lipoproteinleri

x0.5 ve x3 presipitasyon arasında yoğunluk açısından belirgin bir fark görülemedi. Süpernatantda α bantların yoğunluğu x0.5'den x3'e doğru azaldı, fakat bu azalmanın karşılığında presipitatda α bant tespit edilemedi. Presipitasyonda en etkin konsantrasyon x0.5 olarak belirlendi (Şekil 55).

Mevcut presipitasyon prosedürleri ile presipitasyon sonrası agaroz jel elektroforezi ile separe edilen tüm türlere ait serum $\beta + \text{pre-}\beta$ ve α lipoproteinlerin jel üzerindeki bant yoğunlukları gözle değerlendirilerek en az yoğunundan (+) en çok yoğununa (+ + +) doğru derecelendirildi (Tablo 11-18). Ayrıca tablo 19'da insan ve diğer hayvan türlerinde en etkin presipitasyonu sağlayan ayıraç konsantrasyonları gösterildi.

4.3. PRESİPİTASYON AYIRAÇLARIYLA PRESİPİTE EDİLEN İNSAN VE ÇEŞİTLİ HAYVAN TÜRLERİNE AİT SERUM β + pre- β APOLİPOPROTEİNLERİNİN SDS - PAGE ANALİZLERİ

Kullanılan presipitasyon ayraçları (heparin/MnCl₂ , dekstran sülfat/MnCl₂ , sodyum fosfotungstat/MgCl₂ ve polietilen glikol) ile presipite olan insan ve çeşitli hayvan türlerine ait serum β + pre- β lipoproteinlerinin daha iyi karakterizasyonu için apolipoprotein kompozisyonu SDS-PAGE analiziyle ortaya konuldu. Bu amaçla, agaroz jel elektroforez analizleri ışığında β + pre- β lipoproteinlerin tam olarak presipitasyonunu sağlayan (α lipoproteinleri hiç çöktürmeyen) ayraç konsantrasyonlarının kullanıldığı presipitatlar seçildi. β + pre- β lipoproteinlerinin bilinen apolipoprotein kompozisyonu mevcut verilerle karşılaştırıldı.

Tüm türlerde bütün presipitasyon yöntemleri ile presipite edilen β + pre- β lipoproteinlerde 45 KDa protein standartının biraz üst bölgesinde (yaklaşık 46KDa) apo A-IV tespit edildi. Ancak tavuk β + pre- β lipoproteinlerinde apo A-IV polietilen glikol(PEG) ve Dekstran sülfat (DS) presipitasyon metotlarında tespit edilemedi. sodyum fosfotungstat (NaphT) ve heparin presipitasyon metotları ile az da olsa apo A-IV bandı belirlendi. Apo A-I bütün presipitasyon yöntemleri ile tüm türlerin serumundan presipite edilen β + pre- β lipoproteinlerde SDS-PAGE analizinde 24 KDa protein standartı ile aynı bölgede belirlendi. PEG presipitasyon yöntemi ile apo B-48 tavuk ve at hariç tüm türlerde yaklaşık 205 KDa protein standartıyla aynı bölgede görüldü. DS presipitasyon yönteminde yalnızca at ve köpekde apoB-48 birbirine yakın çift band halinde görüldü. Heparin presipitasyonda apo B-48 sadece at ve kedi serum β + pre- β lipoproteinlerinde tespit edilirken, NaphT presipitasyon yönteminde koyun hariç diğer hayvan türlerinin serumunda çok az belirgin olarak 205 KDa protein standartıyla aynı migrasyon bölgesinde tespit edildi. Apo B-100 sadece NaphT presipitasyon yöntemi ile insan serum β + pre- β lipoproteinlerinde numune aplikasyon noktasında tespit edildi. Apo E ve C uygulanan presipitasyon yöntemleri ile izole edilen tüm türlerin serum β + pre- β lipoproteinlerinin hiç birinde belirlenemedi (Şekil 56-63).

Tablo 11.Çeşitli Presipitasyon Yöntemleri ile İzole Edilen İnsan Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramlarındaki Bant Yoğunluklarının Gözle Değerlendirilmesi

PRESİPİTAT				SÜPERNATANT			
Presipitasyon Ayracı	$\beta + \text{pre-}\beta$	α	Presipitasyon Ayracı	$\beta + \text{pre-}\beta$	α		
Hep/MnCl ₂	x0.5	-	Hep/MnCl ₂	x0.5	+++		
	x1	-		x1	+++		
	x2	-		x2	++		
	x3	-		x3	+		
DS/MnCl ₂	x0.5	-	DS/MnCl ₂	x0.5	+++		
	x1	-		x1	+++		
	x2	-		x2	++		
	x3	-		x3	+		
NaphT/MgCl ₂	x1	+++	NaphT/MnCl ₂	x1	+++		
	x2	+++		x2	++		
	x3	+++		x3	+		
PEG8000	x0.5	-	PEG 8000	x0.5	+++		
	x1	-		x1	++		
	x2	-		x2	+		
	x3	-		x3	-		

Hep: Heparin DS: Dekstran Sülfat NaphT: Sodyum Fosfatostat PEG: Polietilen Glikol

Tablo 12. Çeşitli Presipitasyon Yöntemleri ile İzole Edilen Sığır Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramlarındaki Bant Yoğunluklarının Gözle Değerlendirilmesi

PRESİPİTAT			SÜPERNATANT		
Presipitasyon Ayracı	$\beta + \text{pre-}\beta$	α	Presipitasyon Ayracı	$\beta + \text{pre-}\beta$	α
Hep/MnCl ₂	x0.5	-	x0.5	-	+++
	x1	++	x1	-	+++
	x2	+++	x2	-	++
	x3	+++	x3	-	+
DS/MnCl ₂	x1	++	x1	-	++
	x2	+++	x2	-	+
	x3	+++	x3	-	+
NaphT/MgCl ₂	x1	+	x1	-	+++
	x2	+++	x2	-	++
	x3	+++	x3	-	+
PEG8000	x0.5	-	x0.5	-	+++
	x1	++	x1	-	++
	x2	+++	x2	-	+
	x3	+++	x3	-	+

Hep: Heparin DS: Dekstran Sülfat NaphT: Sodyum Fosforat PEG: Polietilen Glikol

Tablo13.Çeşitli Presipitasyon Yöntemleri ile İzole Edilen Koyun Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramlarındaki Bant Yoğunluklarının Gözle Değerlendirilmesi

PRESİPİTAT				SÜPERNATANT			
Presipitasyon Ayracı	$\beta + pre-\beta$	α	Presipitasyon Ayracı	$\beta + pre-\beta$	α		
Hep/MnCl ₂	x0.5	-	Hep/MnCl ₂	x0.5	+++		
	x1	+		x1	+	+++	
	x2	++		x2	-	++	
	x3	+++		x3	-	++	
DS/MnCl ₂	x0.5	-	DS/MnCl ₂	x0.5	+++		
	x1	++		x1	-	+++	
	x2	+++		x2	-	+++	
	x3	+++		x3	-	+++	
NaphT/MgCl ₂	x1	+	NaphT/MnCl ₂	x1	+		
	x2	++		x2	-	++	
	x3	+++		x3	-	+	
PEG8000	x0.5	+	PEG 8000	x0.5	-		
	x1	+++		x1	-	++	
	x2	+++		x2	-	+	
	x3	+++		x3	-	-	

Hep: Heparin DS: Dekstran Sülfat NaphT: Sodyum Fosfogstat PEG: Polietilen Glikol

Tablo 14.Çeşitli Presipitasyon Yöntemleri ile İzole Edilen Keçi Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramlarındaki Bant Yoğunluklarının Gözle Değerlendirilmesi

PRESİPİTAT				SÜPERNATANT			
Presipitasyon Ayracı	β + pre- β	α	Presipitasyon Ayracı	β + pre- β	α		
Hep/MnCl ₂	x0.5	-	Hep/MnCl ₂	x0.5	+++		
	x1	-		x1	-	+++	
	x2	+++		x2	-	+++	
	x3	+++		x3	-	+++	
DS/MnCl ₂	x0.5	-	DS/MnCl ₂	x0.5	+++		
	x1	-		x1	-	+++	
	x2	+++		x2	-	+++	
	x3	+++		x3	-	+	
NaphT/MgCl ₂	x1	++	NaphT/MnCl ₂	x1	+		
	x2	+++		x2	-	++	
	x3	+++		x3	-	+	
PEG8000	x0.5	+	PEG 8000	x0.5	-		
	x1	++		x1	-	++	
	x2	+++		x2	-	+	
	x3	+++		x3	-	+	

Hep: Heparin DS: Dekttran Sülfat NaphT: Sodyum Fosfatostat PEG: Polietilen Glikol

Tablo 15. Çeşitli Presipitasyon Yöntemleri ile İzole Edilen Kedi Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramlarındaki Bant Yoğunluklarının Gözle Değerlendirilmesi

PRESİPİTAT			SÜPERNATANT		
Presipitasyon Ayracı	$\beta + \text{pre-}\beta$	α	Presipitasyon Ayracı	$\beta + \text{pre-}\beta$	α
Hep/MnCl ₂	x0.5	+	x0.5	++	+++
	x1	+++	x1	-	+++
	x2	+++	x2	-	++
	x3	+++	x3	-	++
DS/MnCl ₂	x0.5	+	x0.5	++	+++
	x1	+++	x1	-	+++
	x2	+++	x2	-	++
	x3	+++	x3	-	+
NaphT/MgCl ₂	x1	+++	x1	-	+++
	x2	+++	x2	-	++
	x3	+++	x3	-	+
PEG8000	x0.5	+++	x0.5		+++
	x1	+++	x1	-	++
	x2	+++	x2	-	+
	x3	+++	x3	-	-

Hep: Heparin DS: Dekstran Sülfat NaphT: Sodyum Fosforat PEG: Polietilen Glikol

Tablo16.Çeşitli Presipitasyon Yöntemleri ile İzole Edilen Köpek Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramlarındaki Bant Yoğunluklarının Gözle Değerlendirilmesi

PRESİPİTAT				SÜPERNATANT			
Presipitasyon Ayırıcı	β + pre- β	α	Presipitasyon Ayırıcı	β + pre- β	α		
Hep/MnCl ₂	x0.5	+	Hep/MnCl ₂	x0.5	++		
	x1	++		x1	-		
	x2	+++		x2	-		
	x3	+++		x3	-		
DS/MnCl ₂	x0.5	++	DS/MnCl ₂	x0.5	+		
	x1	+++		x1	-		
	x2	+++		x2	-		
	x3	+++		x3	-		
NaphT/MgCl ₂	x0.5	+	NaphT/MnCl ₂	x0.5	-		
	x1	++		x1	-		
	x2	+++		x2	-		
	x3	+++		x3	-		
PEG8000	x0.5	+	PEG 8000	x0.5	-		
	x1	+++		x1	-		
	x2	+++		x2	-		
	x3	+++		x3	-		

Hep: Heparin DS: Dekstran Sülfat NaphT: Sodyum Fosfogstat PEG: Polietilen Glikol

Tablo17. Çeşitli Presipitasyon Yöntemleri ile İzole Edilen At Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramlarındaki Bant Yoğunluklarının Gözle Değerlendirilmesi

PRESİPİTAT				SÜPERNATANT			
Presipitasyon Ayıracağı	$\beta + \text{pre-}\beta$	α	Presipitasyon Ayıracağı	$\beta + \text{pre-}\beta$	α		
Hep/MnCl ₂	x0.5	+	Hep/MnCl ₂	x0.5	++		
	x1	+++		x1	-	+++	
	x2	+++		x2	-	++	
	x3	+++		x3	-	+	
DS/MnCl ₂	x0.5	-	DS/MnCl ₂	x0.5	+++		
	x1	+++		x1	-	+++	
	x2	+++		x2	-	++	
	x3	+++		x3	-	+	
NaphT/MgCl ₂	x0.5	+	NaphT/MnCl ₂	x0.5	-		
	x1	++		x1	-	++	
	x2	+++		x2	-	++	
	x3	+++		x3	-	+	
PEG8000	x0.5	+	PEG 8000	x0.5	-		
	x1	+++		x1	-	+++	
	x2	+++		x2	-	+	
	x3	+++		x3	-	-	

Hep: Heparin DS: Dekstran Sülfat NaphT: Sodyum Fosforat PEG: Polietilen Glikol

Tablo 18 . Çeşitli Presipitasyon Yöntemleri ile İzole Edilen Tavuk Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramlarındaki Bant Yoğunluklarının Gözle Değerlendirilmesi

PRESİPİTAT				SÜPERNATANT			
Presipitasyon Ayıracağı	$\beta + \text{pre-}\beta$	α	Presipitasyon Ayıracağı	$\beta + \text{pre-}\beta$	α		
Hep/MnCl ₂	x0.5	+++	Hep/MnCl ₂	x0.5	-		
	x1	+++		x1	-		
	x2	+++		x2	-		
	x3	+++		x3	-		
DS/MnCl ₂	x0.5	+	DS/MnCl ₂	x0.5	-		
	x1	+++		x1	-		
	x2	+++		x2	-		
	x3	+++		x3	-		
NaphT/MgCl ₂	x1	+++	NaphT/MnCl ₂	x1	-		
	x2	+++		x2	-		
	x3	+++		x3	-		
PEG8000	x0.5	+++	PEG 8000	x0.5	-		
	x1	+++		x1	-		
	x2	+++		x2	-		
	x3	+++		x3	-		

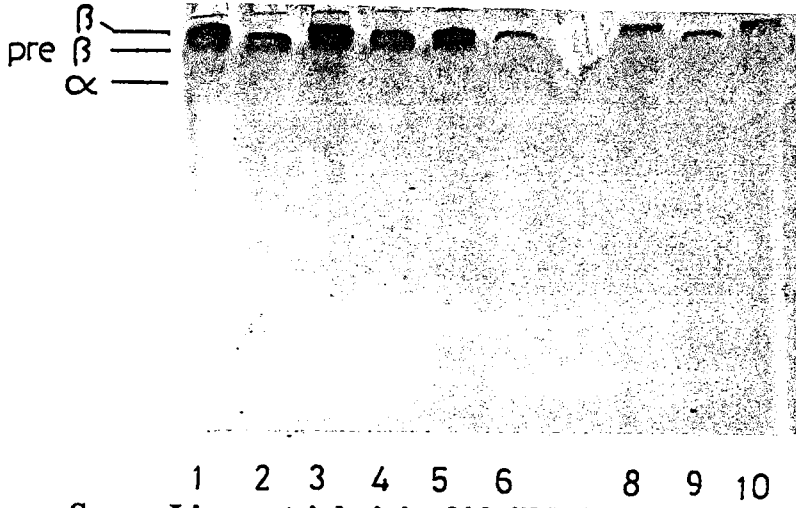
Hep: Heparin DS: Dekstran Sülfat NaphT: Sodyum Fosforat PEG: Polietilen Glikol

Tablo 19. İnsan ve Çeşitli Hayvan Türlerinde Serum β +pre- β Lipoproteinlerini Tam Olarak Presipite Etmek İçin Gerekli İdeal Ayıraç Konsantrasyonları^a

	<u>HEPARİN</u>	<u>DEKSTRAN SÜLFAT</u>	<u>FOSFOTUNGSTAT</u>	<u>POLIETİLEN GLİKOL^b</u>
İNSAN	x1	x1	x1	x1
SIĞIR	x2	x1	x1	x1
KOYUN	x1	x1	x2	x1
KEÇİ	x1	x1	x2	x1
KÖPEK	x1	x1	x1	x1
KEDİ	x1	x1	x1	x1
TAVUK	x0.5	x1	x1	x0.5
AT	x1	x1	x1	x1

a : Ayıraç konsantrasyonları insan serum β +pre- β lipoproteinlerin presipitasyonu için kullanılan konsantrasyonlar (x1) baz alınarak diğer konsantrasyonlar bunun katları şeklinde ifade edilmiştir.

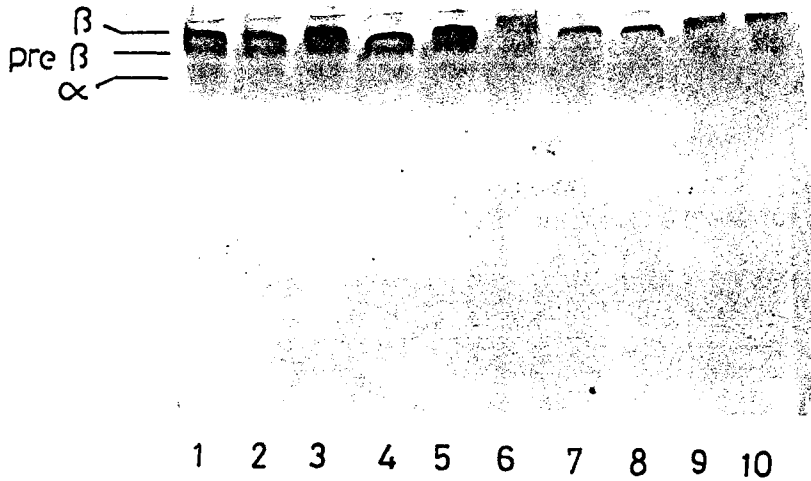
b : Presipitatta, β +pre- β lipoproteinler ile PEG'ün oluşturdukları kompleksler disosiyasyonla edilemediğinden agaroz jel elektroforezde β +pre- β ve α lipoprotein separasyonu yeterli değildir.



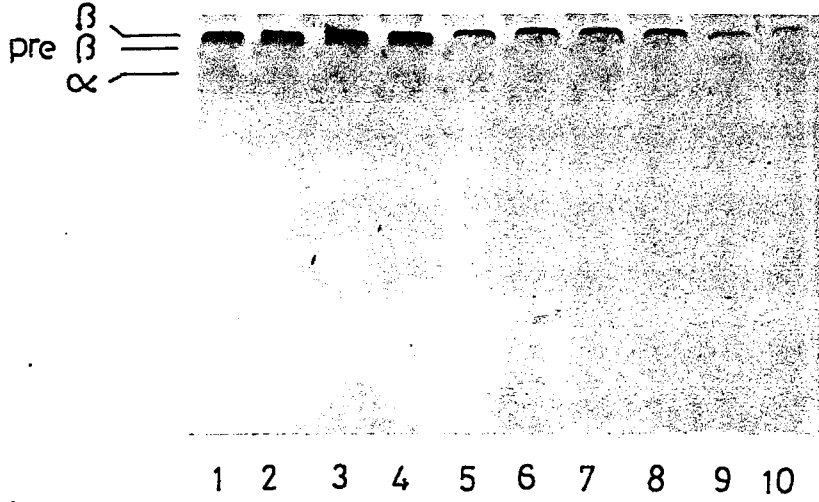
Şekil 5 . İnsan Serum Lipoproteinlerinin %0.6'lık Agaroz Jel Elektroforetogramı
 1,2,3,4,5 : İnsan serumu 6,8,9,10 : Koyun serumu



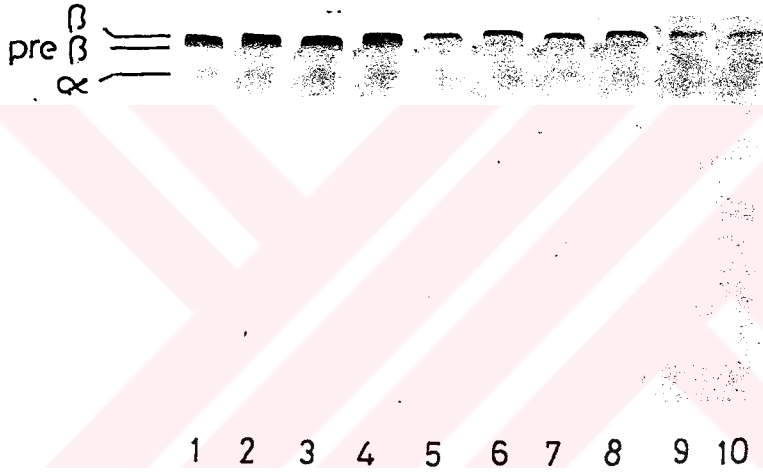
Şekil 6 . İnsan Serum Lipoproteinlerinin %0.7'lik Agaroz Jel Elektroforetogramı
 1,2,3,4,5 : İnsan serumu 6,7,8,9,10 : Koyun serumu



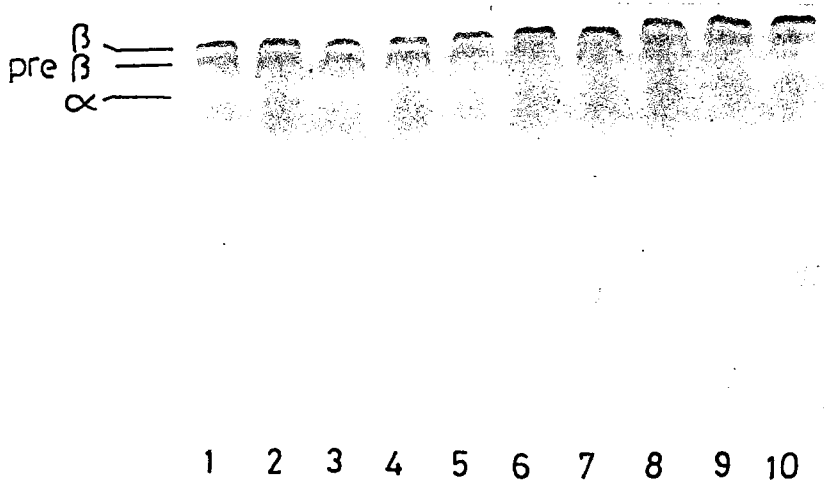
Şekil 7 . İnsan Serum Lipoproteinlerinin %0.8'lik Agaroz Jel Elektroforetogramı
 1,2,3,4,5 : İnsan serumu 6,7,8,9,10 : Koyun serumu



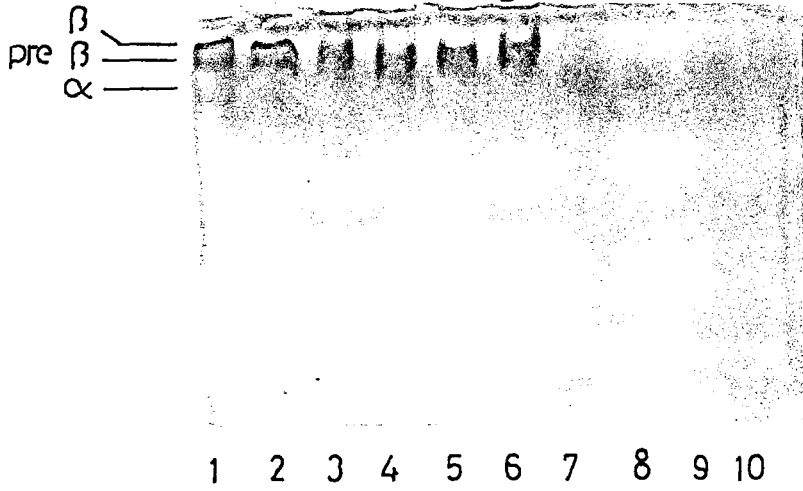
Şekil 8. İnsan Serum Lipoproteinlerinin % 0.9'luk Agaroz Jel Elektroforetogramı
 1,2,3,4 : İnsan serumu 5,6,7,8 : İnsan plazması 9,10 : Keçi plazması



Şekil 9 . İnsan Serum Lipoproteinlerinin %1'lik Agaroz Jel Elektroforetogramı
 1,2,3,4 : İnsan serumu 5,6,7,8 : İnsan plazması 9,10 : Keçi plazması

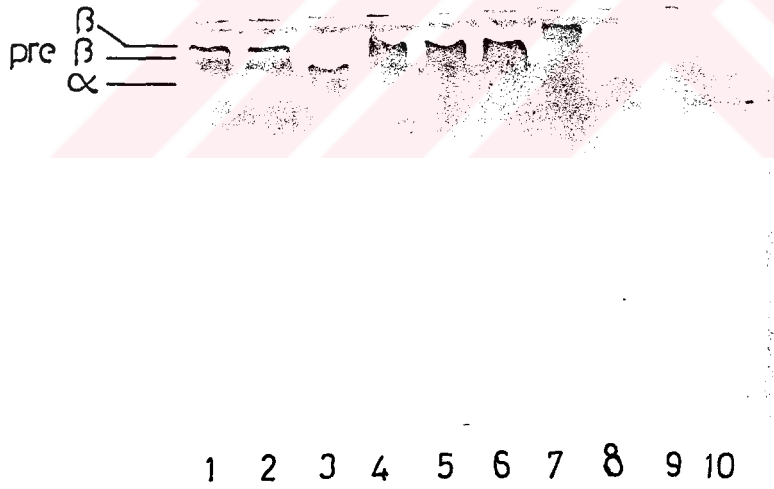


Şekil 10. İnsan Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı (% 0.8)



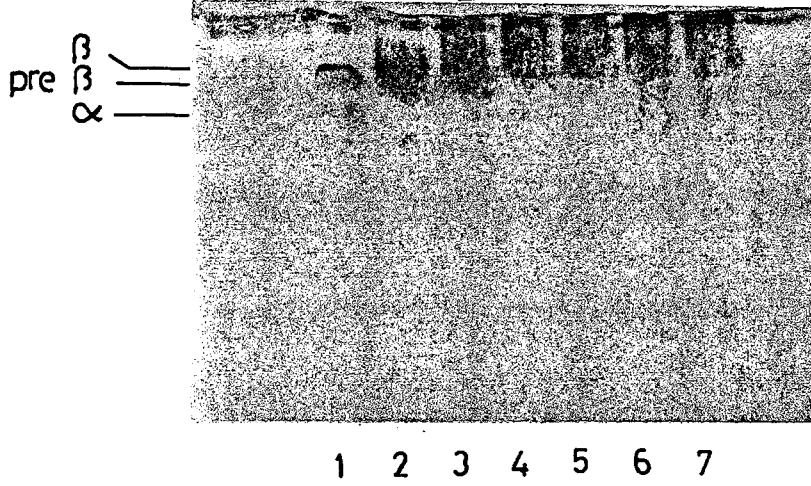
Şekil 11. Heparin Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen İnsan Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



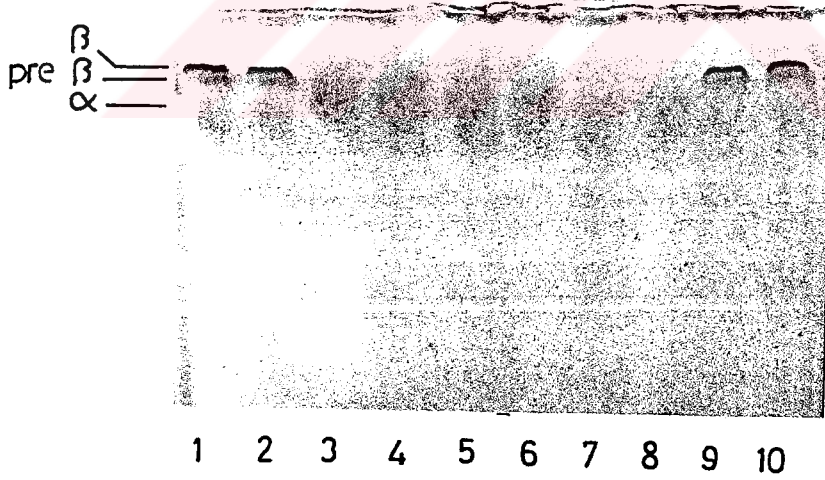
Şekil 12 . Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen İnsan Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



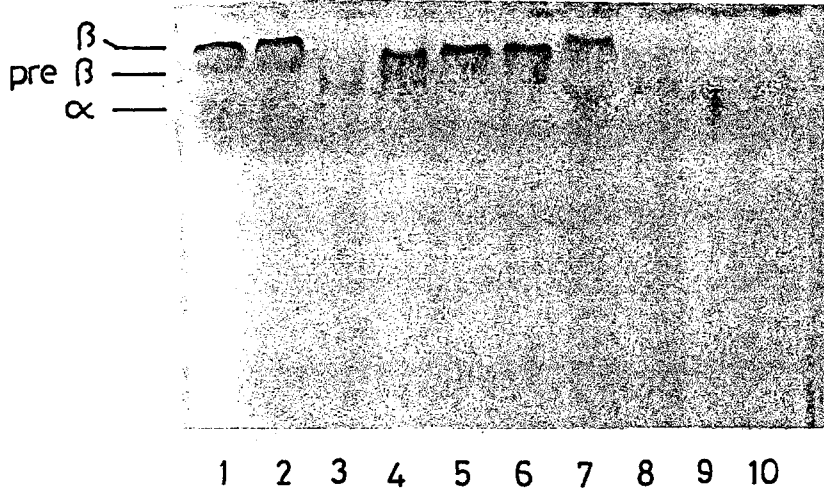
Şekil 13. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen İnsan Serum β + pre- β Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

1 : İnsan serumu
2,3 : NaphT presipitasyon (x1)
4,5 : NaphT presipitasyon (x2)
6,7 : NaphT presipitasyon (x3)



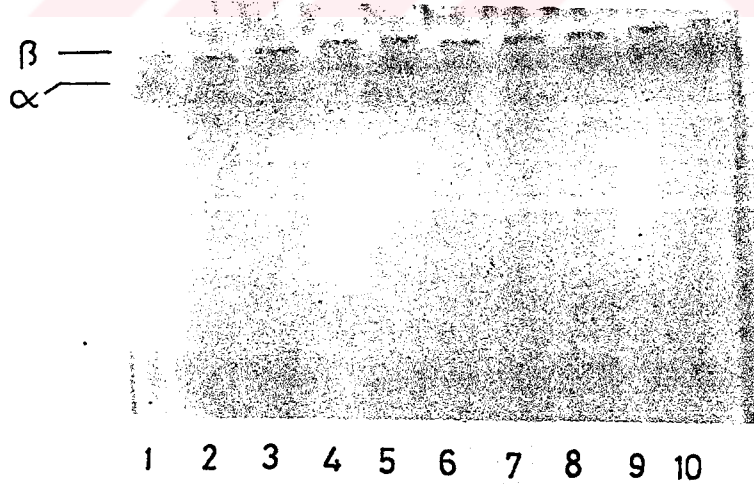
Şekil 14 . Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen İnsan Serum α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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

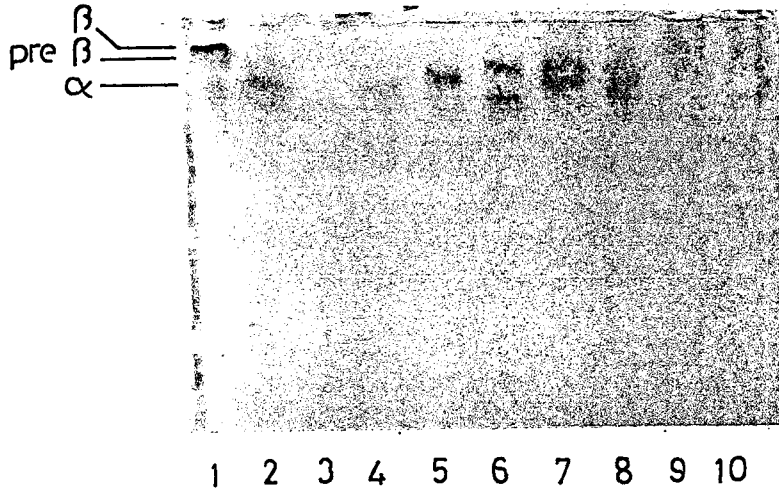


Şekil 15. Polietilen Glikol (PEG) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen İnsan Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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

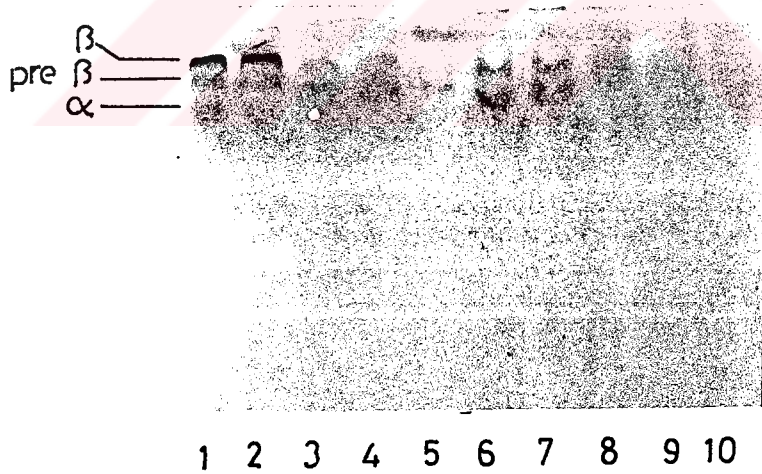


Şekil 16 . Sığır Serum Lipoproteinlerinin Agaroz jel Elektroforetogramı



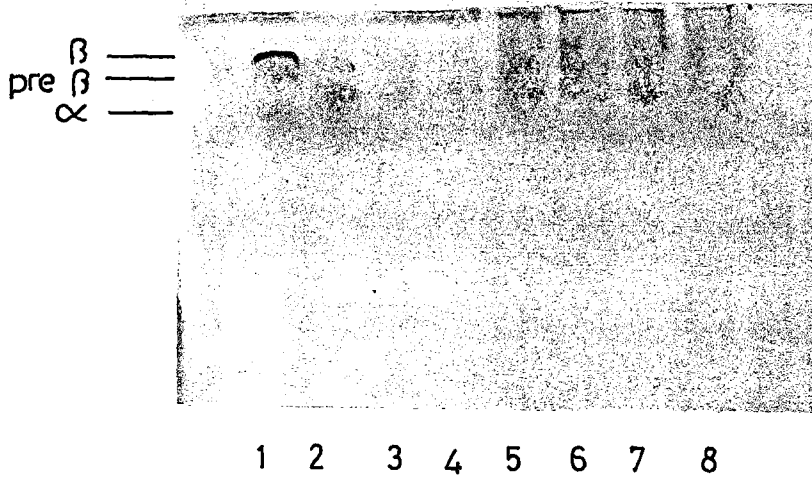
Şekil 17. Heparin Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Sığır Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



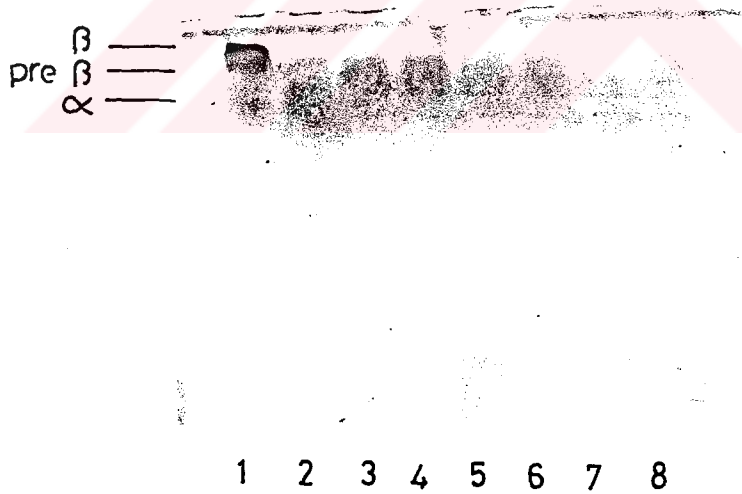
Şekil 18. Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Sığır Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

- | | | |
|--------------------|------------------------|--------------------------|
| 1,2 : İnsan serumu | 5 : DS presipitat (x1) | 8 : DS süpernatant (x1) |
| 3,4 : Sığır serumu | 6 : DS presipitat (x2) | 9 : DS süpernatant (x2) |
| | 7 : DS presipitat (x3) | 10 : DS süpernatant (x3) |



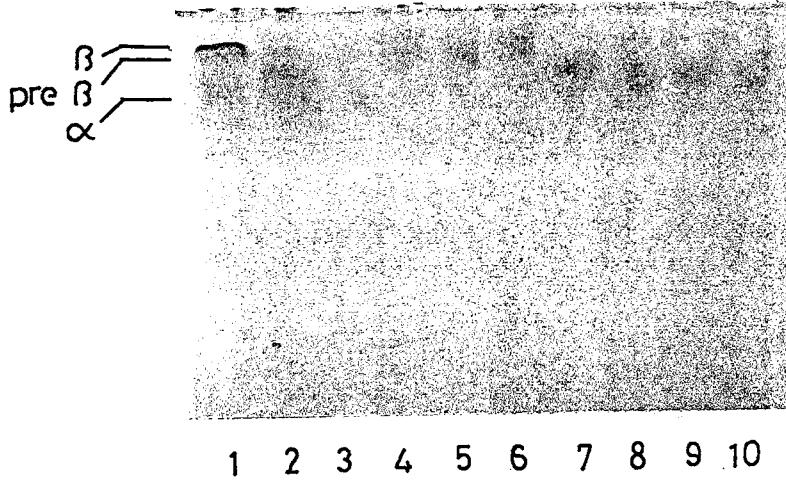
Şekil 19. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Sığır Serum β + pre- β Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

1 : İnsan serumu 3,4 : NaphT presipitat (x1) 7,8 : NaphT presipitat (x3)
2 : Sığır serumu 5,6 : NaphT presipitat (x2)



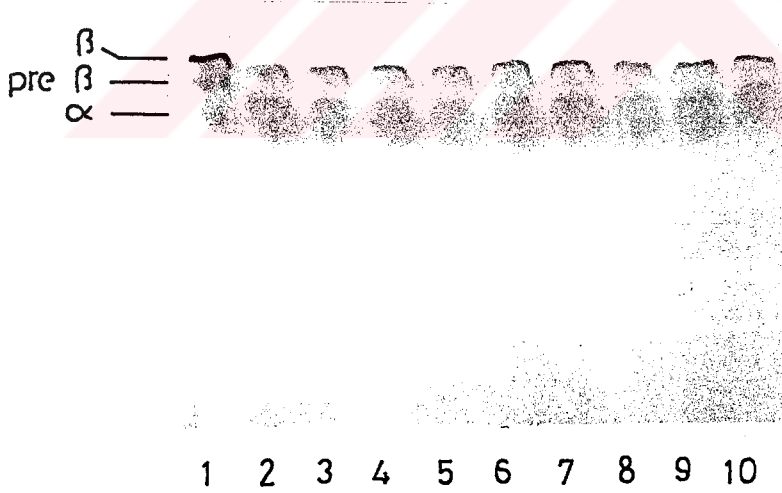
Şekil 20. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Sığır Serum α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

1 : İnsan serumu 3,4 : NaphT süpernatant (x1) 7,8 : NaphT süpernatant (x3)
2 : Sığır serumu 5,6 : NaphT süpernatant (x2)



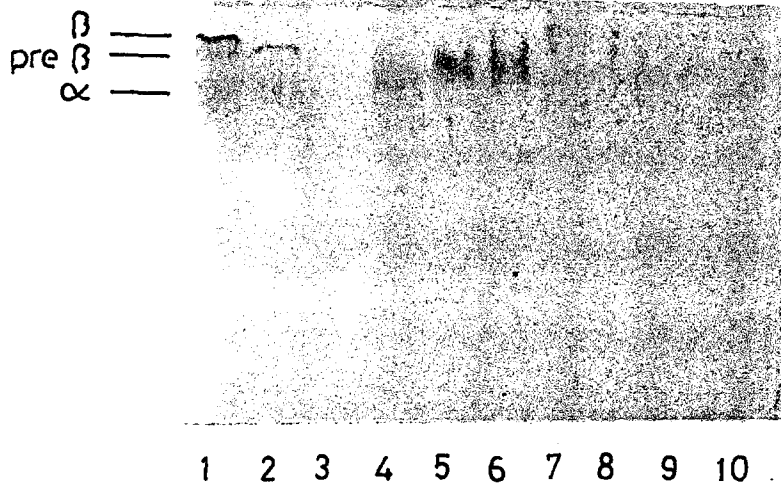
Şekil 21. Polietilen Glikol (PEG) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Sığır Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



Şekil 22 . Koyun Serum Lipoproteinlerinin Agaroz jel Elektroforetogramı

- 1 : İnsan serumu



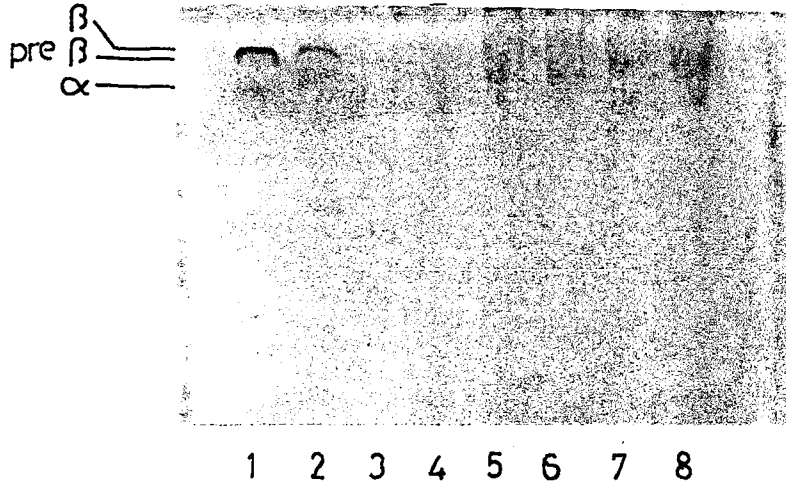
Şekil 23 . Heparin Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Koyun Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



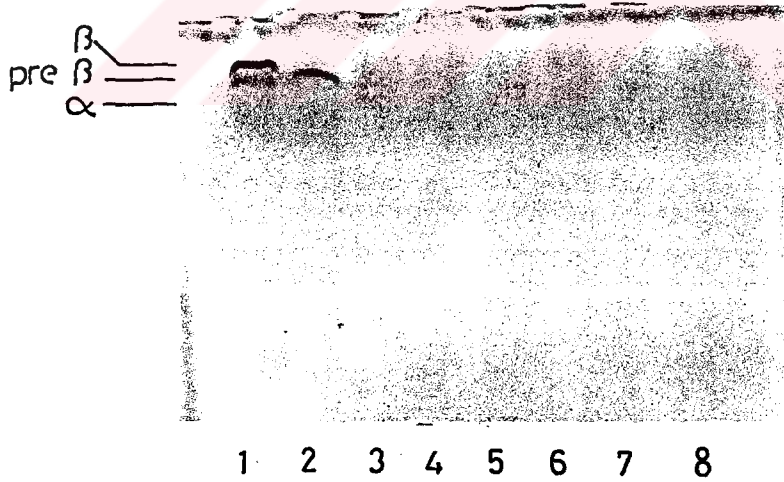
Şekil 24 . Dekstran sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Koyun Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



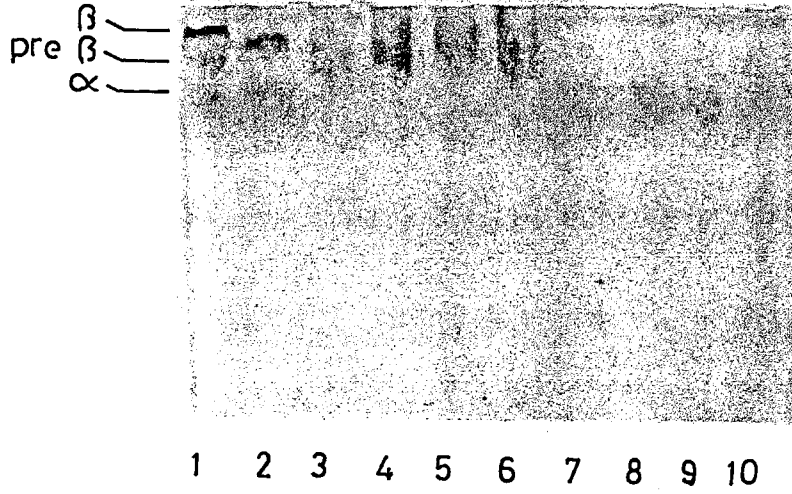
Şekil 25. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Koyun Serum β + pre- β Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

1 : İnsan serum 3,4 : NaphT presipitat (x1) 7,8 : NaphT presipitat (x3)
2 : Koyun serum 5,6 : NaphT presipitat (x2)



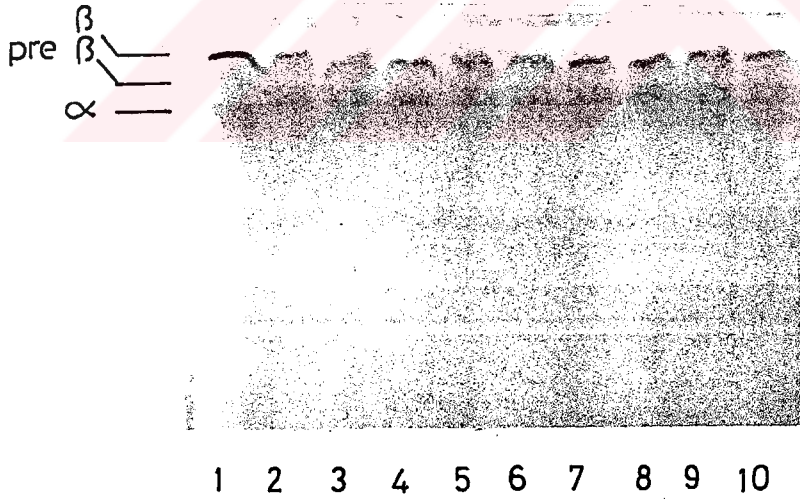
Şekil 26. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Koyun Serum α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

1 : İnsan serumu 3,4 : NaphT süpernatant (x1) 7,8 : NaphT süpernatant (x3)
2 : Koyun serumu 5,6 : NaphT süpernatant (x2)



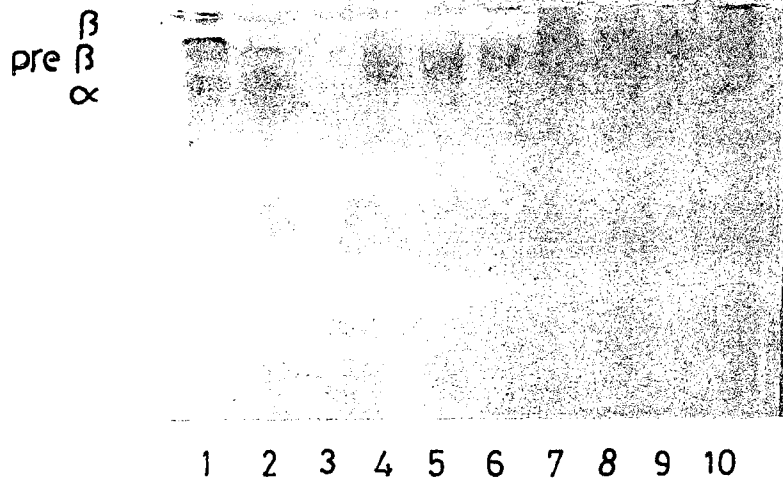
Şekil 27. Polietilen Glikol (PEG) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Koyun Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



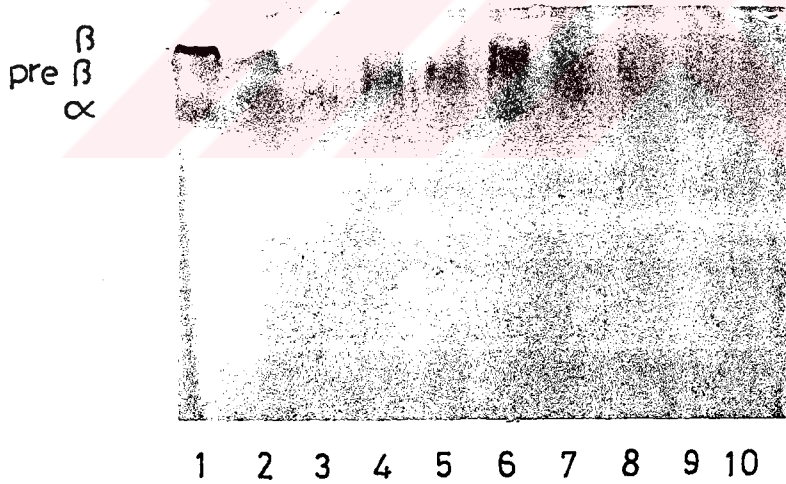
Şekil 28. Keçi Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

- 1 : İnsan serumu



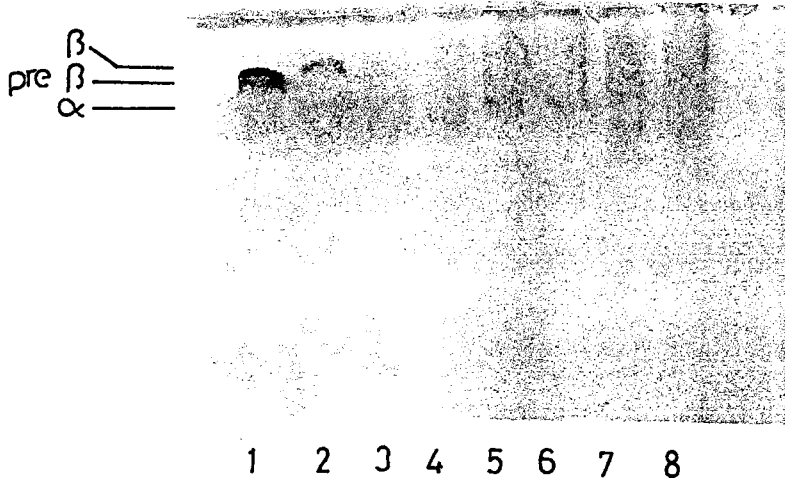
Şekil 29. Heparin Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Keçi Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

- | | | |
|------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 1 : İnsan serumu | 3 : Heparin presipitat (x0.5) | 7 : Heparin süpernatant (x0.5) |
| 2 : Keçi serumu | 4 : Heparin presipitat (x1) | 8 : Heparin süpernatant (x1) |
| | 5 : Heparin presipitat (x2) | 9 : Heparin süpernatant (x2) |
| | 6 : Heparin presipitat (x3) | 10 : Heparin süpernatant (x3) |



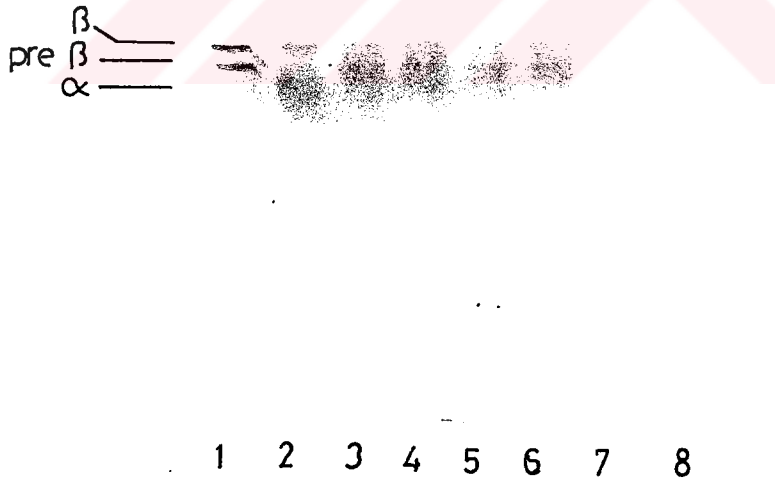
Şekil 30. Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Keçi Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

- | | | |
|------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1 : İnsan serumu | 3 : DS presipitat (x0.5) | 7 : DS süpernatant (x0.5) |
| 2 : Keçi serumu | 4 : DS presipitat (x1) | 8 : DS süpernatant (x1) |
| | 5 : DS presipitat x2 | 9 : DS süpernatant x2 |
| | 6 : DS presipitat x3 | 10 : DS süpernatant x3 |



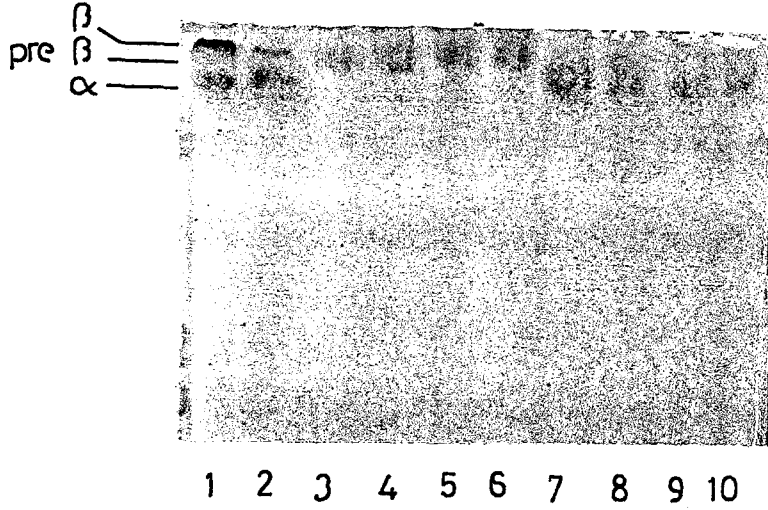
Şekil 31. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Keçi Serum β + pre- β Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

1 : İnsan serumu 3,4 : NaphT presipitat (x1) 7,8 : NaphT presipitat (x3)
2 : Keçi serumu 5,6 : NaphT presipitat (x2)



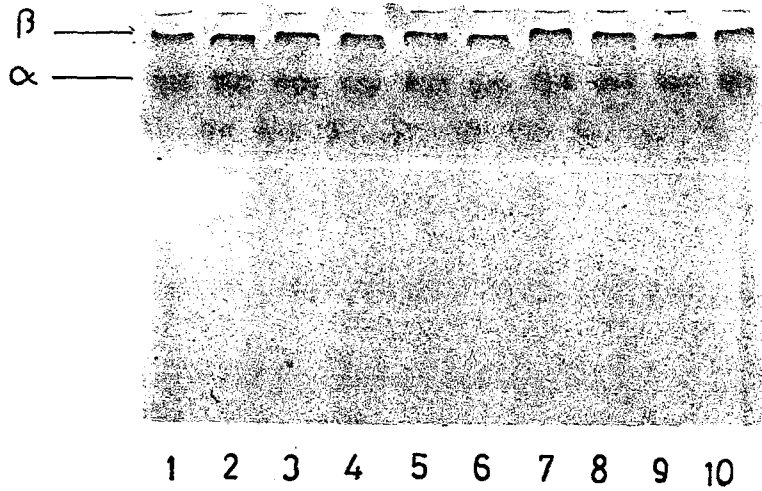
Şekil 32. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Keçi Serum α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

1 : İnsan serumu 3,4 : NaphT süpernatant (x1) 7,8 : NaphT süpernatant (x3)
2 : Keçi serumu 5,6 : NaphT süpernatant (x2)

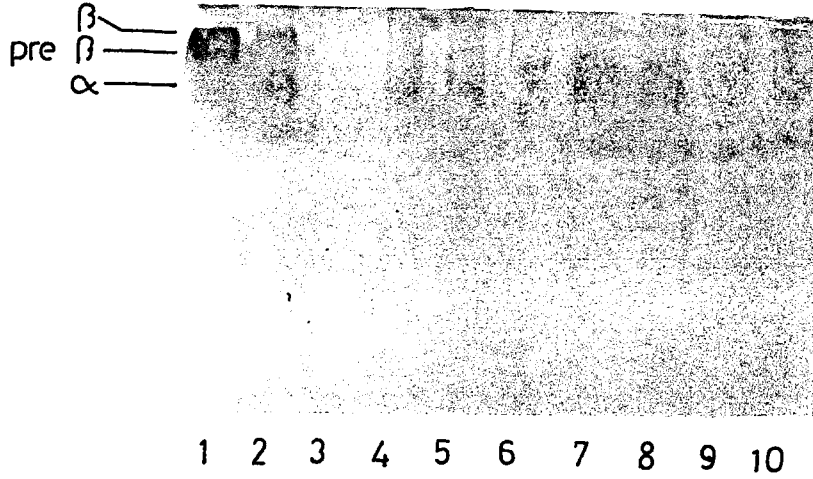


Şekil 33. Polietilen Glikol (PEG) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Keçi Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

- | | | |
|------------------|---------------------------|----------------------------|
| 1 : İnsan serumu | 3 : PEG presipitat (x0.5) | 7 : PEG süpernatant (x0.5) |
| 2 : Keçi serumu | 4 : PEG presipitat (x1) | 8 : PEG süpernatant (x1) |
| | 5 : PEG presipitat (x2) | 9 : PEG süpernatant (x2) |
| | 6 : PEG presipitat (x3) | 10 : PEG süpernatant (x3) |

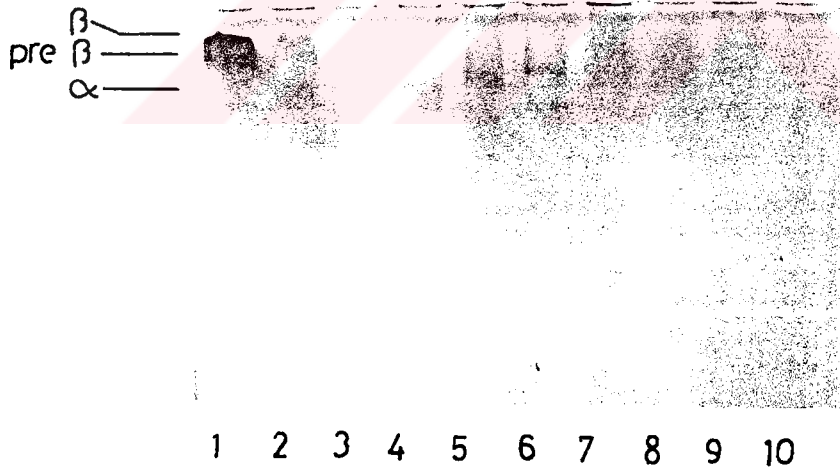


Şekil 34. Kedi Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı



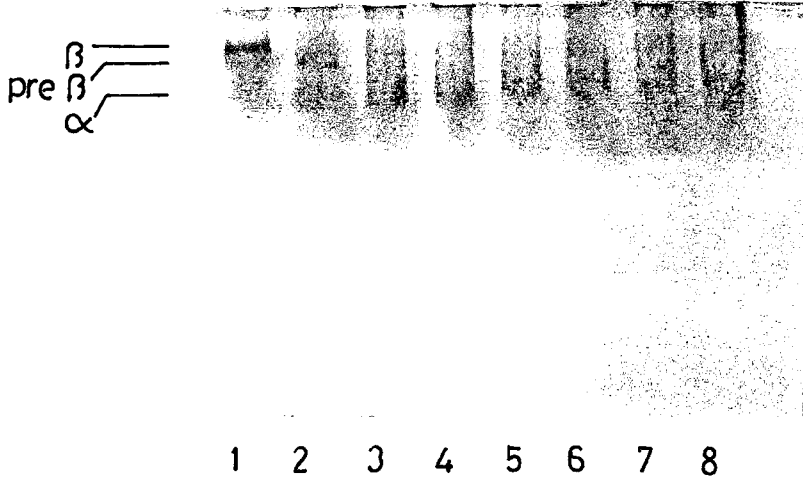
Şekil 35 . Heparin Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Kedi Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



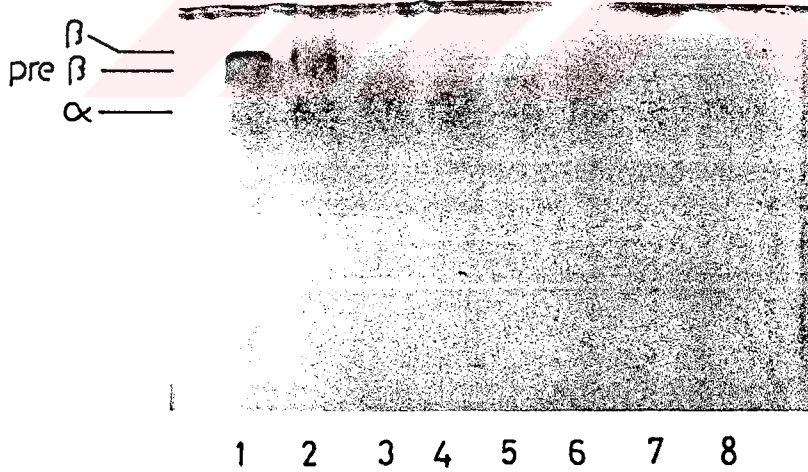
Şekil 36. Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Kedi Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



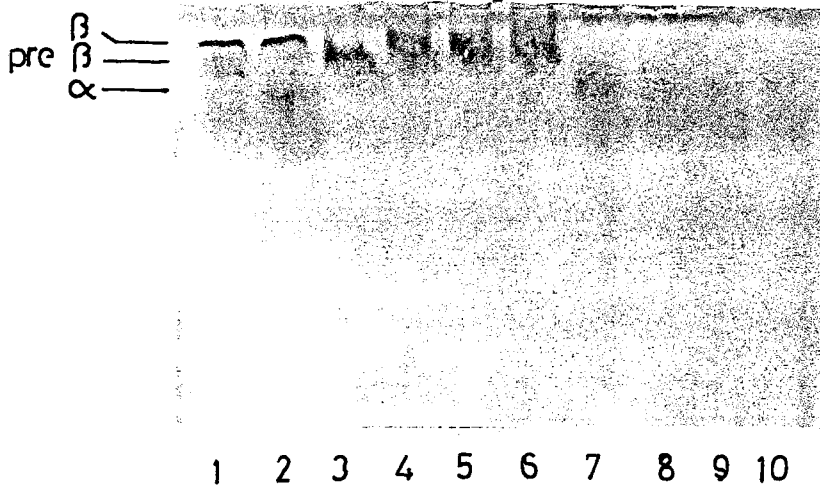
Şekil 37 . Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Kedi Serum β + pre- β Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

1 : İnsan serumu 3,4 : NaphT presipitat (x1) 7,8 : NaphT presipitat (x3)
2 : Kedi serumu 5,6 : NaphT presipitat (x2)



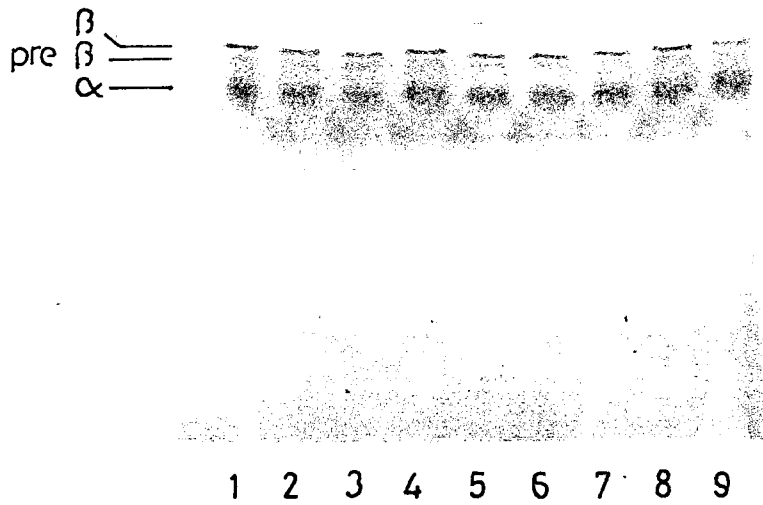
Şekil 38. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Kedi Serum α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

1 : İnsan serumu 3,4 : NaphT süpernatant (x1) 7,8 : NaphT süpernatant (x3)
2 : Kedi serumu 5,6 : NaphT süpernatant (x2)

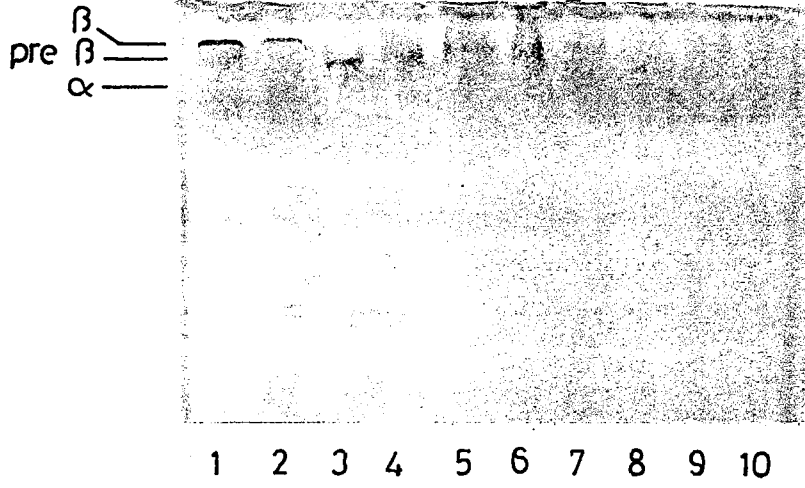


Şekil 39. Polietilen Glikol (PEG) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Kedi Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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

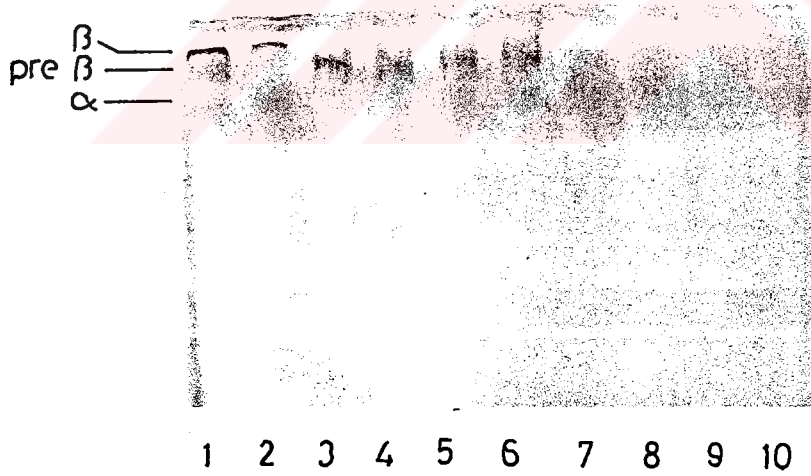


Şekil 40. Köpek Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı



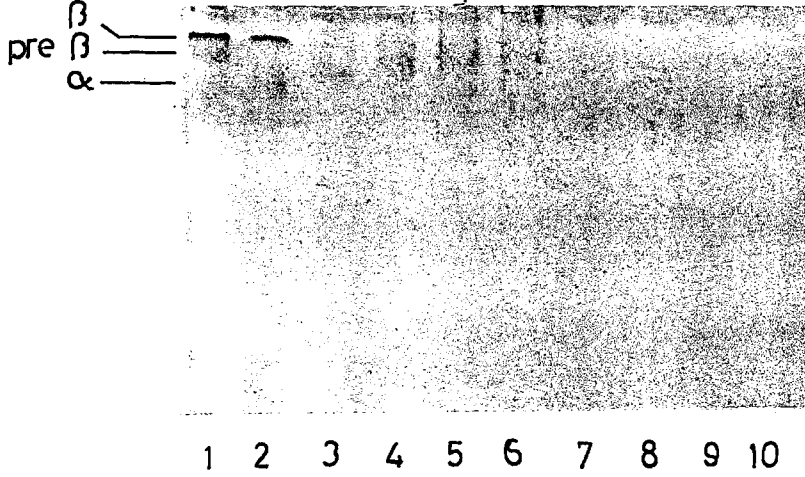
Şekil 41. Heparin Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Köpek Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



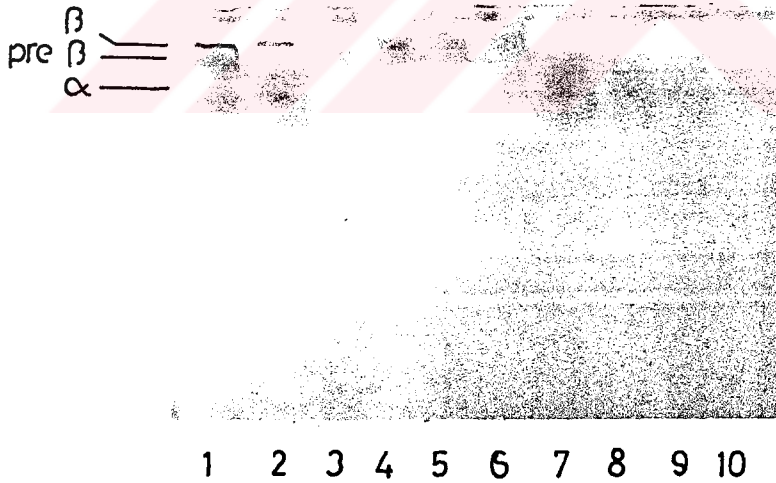
Şekil 42. Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Köpek Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



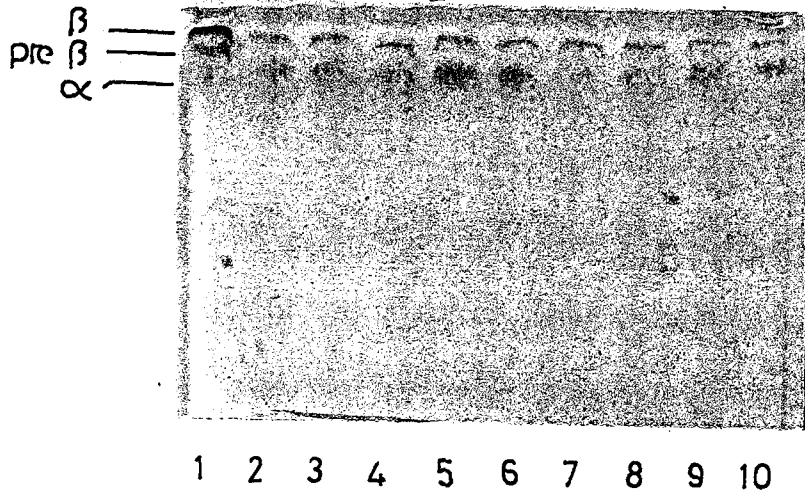
Şekil 43. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Köpek Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



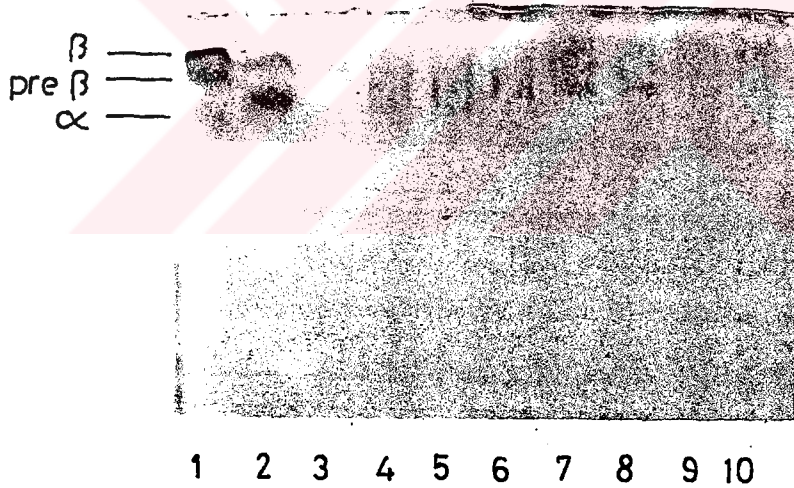
Şekil 44. Polietilen Glikol (PEG) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Köpek Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



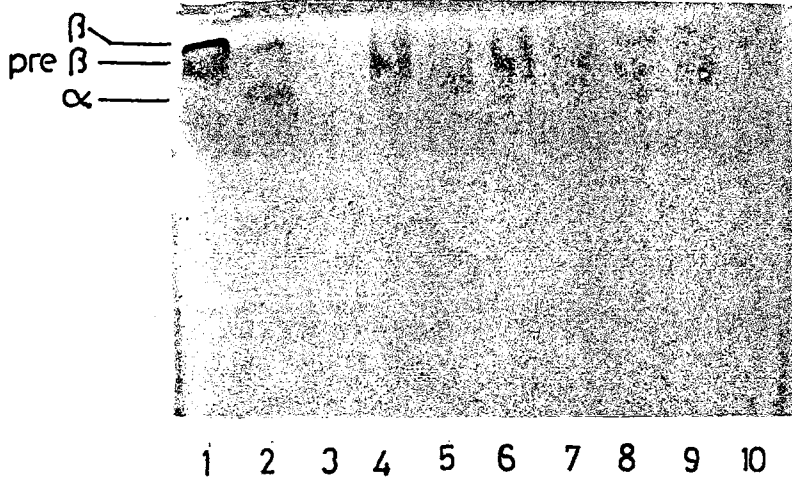
Şekil 45. At Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

1: İnsan serumu



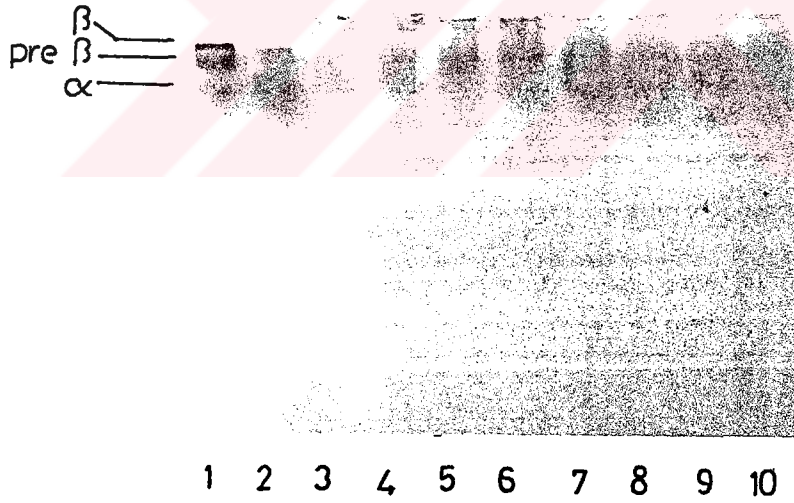
Şekil 46. Heparin Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen At Serum $\beta + \text{pre-}\beta$ ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



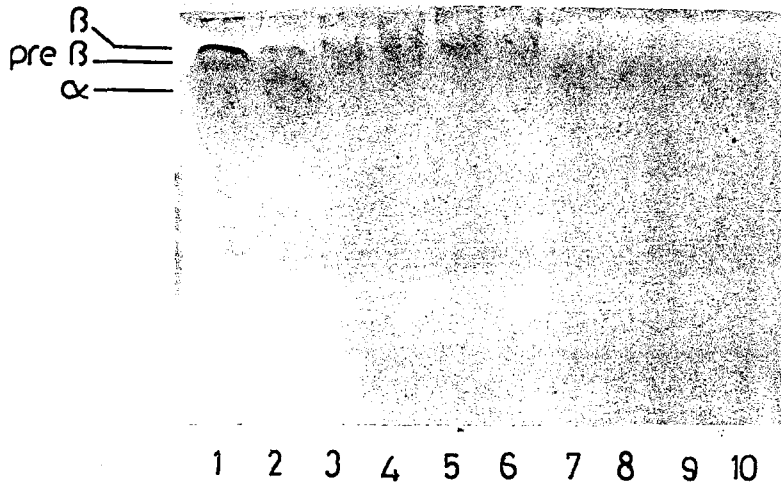
Şekil 47. Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen At Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



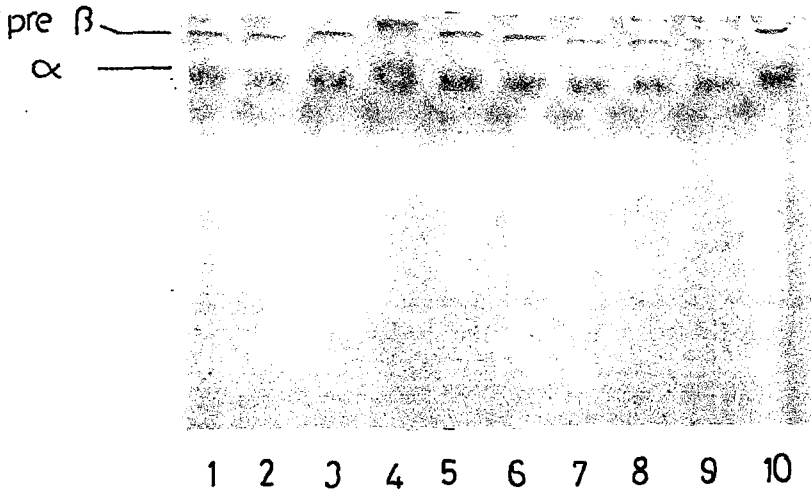
Şekil 48. Sodyum Fosforungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen At Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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

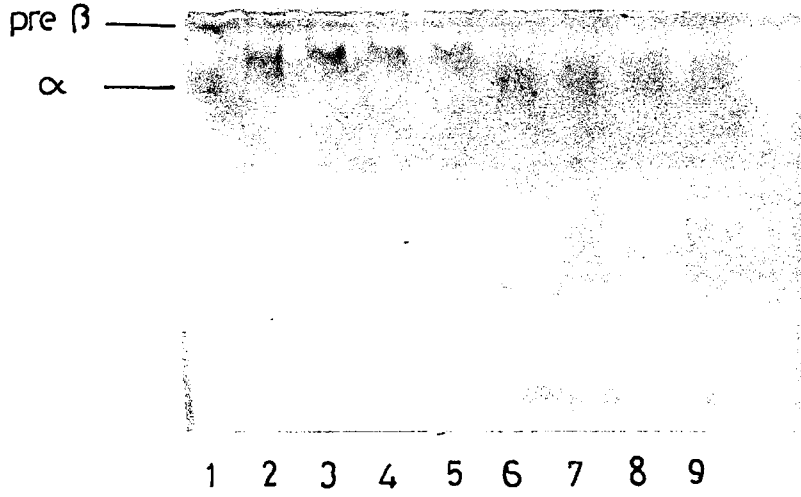


Şekil 49. Polietilen Glikol (PEG) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen At Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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

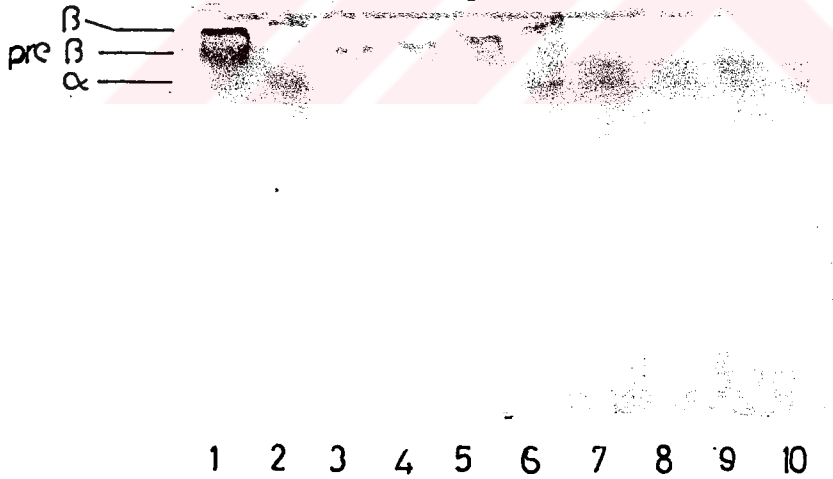


Şekil 50. Tavuk Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı



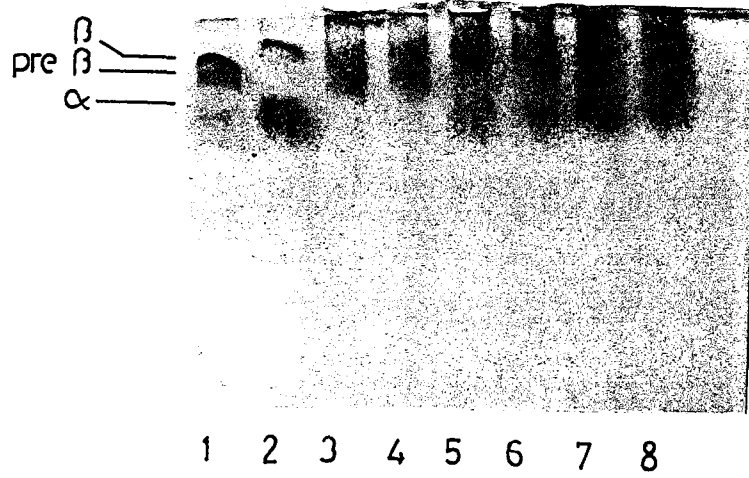
Şekil 51. Heparin Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Tavuk Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



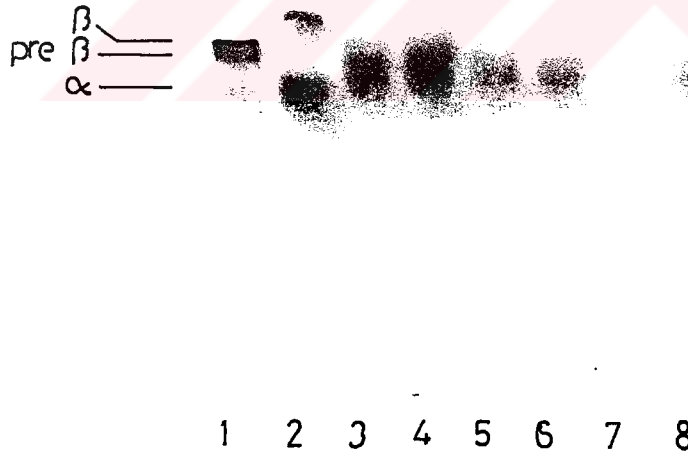
Şekil 52. Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Tavuk Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

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



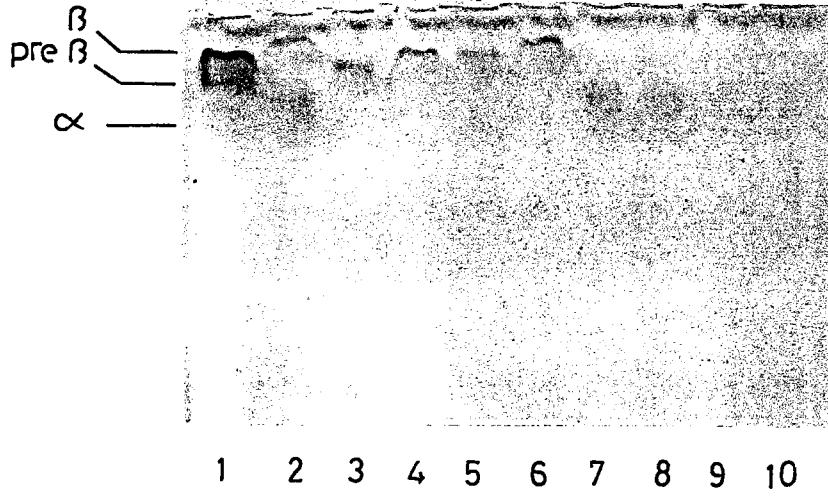
Şekil 53. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Tavuk Serum β + pre- β Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

1 : İnsan serumu 3,4 : NaphT presipitat (x1) 7,8 : NaphT presipitat (x3)
2 : Tavuk serumu 5,6 : NaphT presipitat (x2)



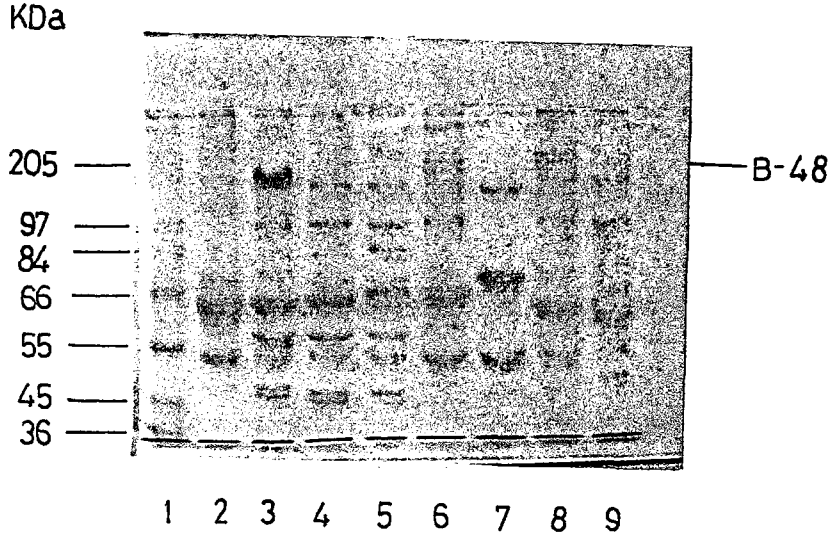
Şekil 54. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Tavuk Serum α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

1 : İnsan serumu 3,4 : NaphT süpernatant (x1) 7,8 : NaphT süpernatant (x3)
2 : Tavuk serumu 5,6 : NaphT süpernatant (x2)



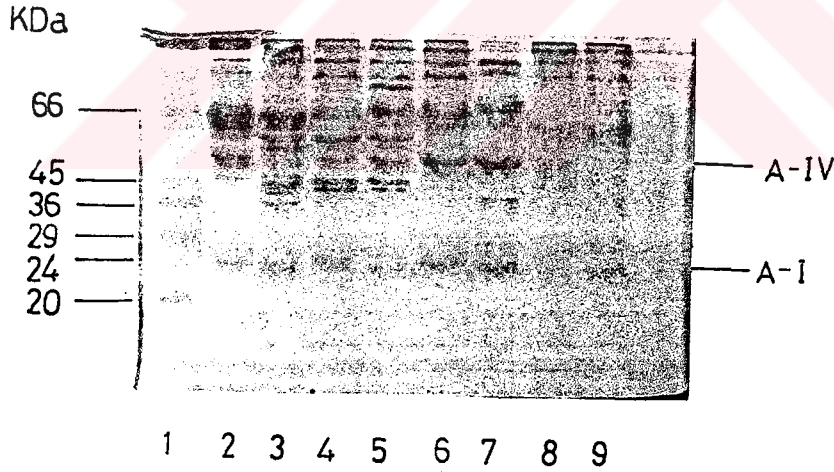
Şekil 55. Polietilen Glikol (PEG) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Tavuk Serum β + pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforetogramı

- | | | |
|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 : İnsan serumu | 3 : PEG presipitat (x0.5) | 7 : PEG süpernatant (x0.5) |
| 2 : Tavuk serumu | 4 : PEG presipitat (x1) | 8 : PEG süpernatant (x1) |
| | 5 : PEG presipitat (x2) | 9 : PEG süpernatant (x2) |
| | 6 : PEG presipitat (x3) | 10 : PEG süpernatant (x3) |



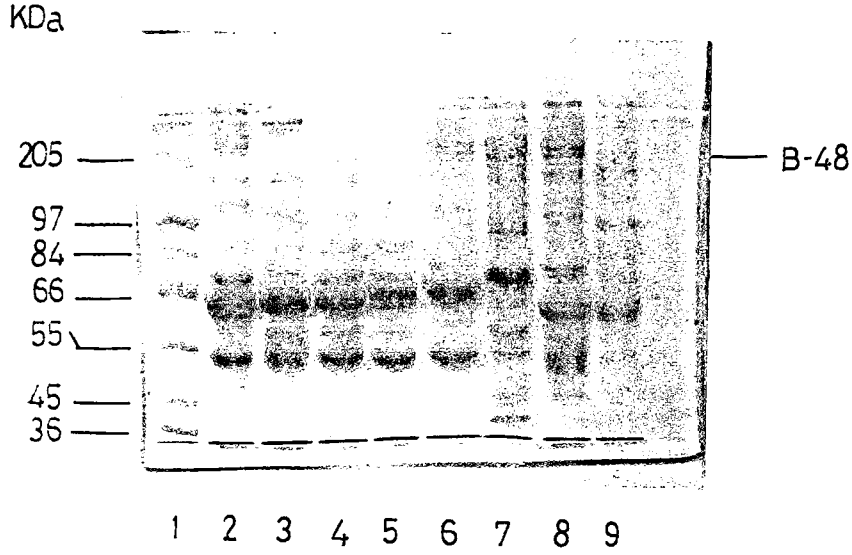
Şekil 56. İnsan ve Diğer Hayvan Türlerinin Heparin Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Serum β + pre- β Apolipoproteinlerinin SDS - PAGE (%7.5) Elektroforetogramları

- | | | |
|---------------------------|------------------------|-----------------------|
| 1: Standart (yüksek M.W.) | 4 : Koyun Heparin (x1) | 7: Köpek Heparin x1 |
| 2 : İnsan Heparin (x1) | 5 : Keçi Heparin (x1) | 8: At Heparin x1 |
| 3 : Sığır Heparin (x 2) | 6 : Kedi Heparin (x1) | 9: Tavuk Heparin x0.5 |



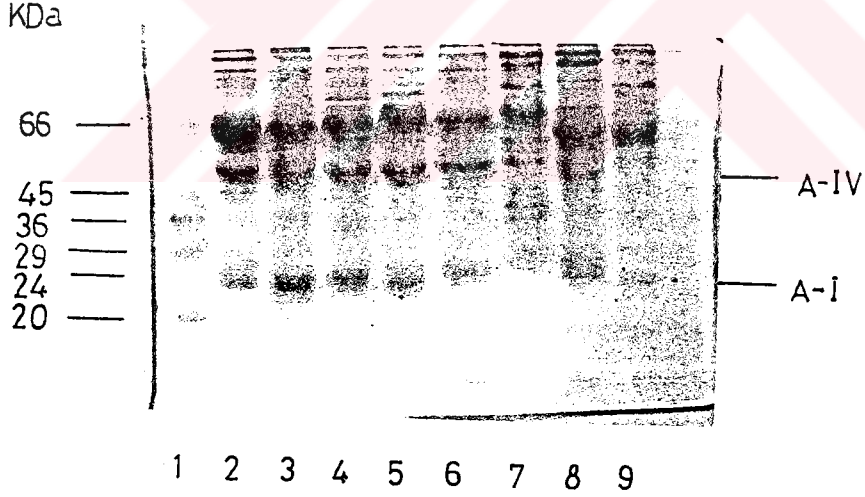
Şekil 57 .İnsan ve Diğer Hayvan Türlerinin Heparin Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Serum β + pre- β Apolipoproteinlerinin SDS - PAGE (%12) Elektroforetogramları

- | | | |
|---------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1: Standart (Düşük M.W.) | 4: Koyun Heparin (x1) | 7: Köpek Heparin (x1) |
| 2: İnsan Heparin (x1) | 5: Keçi Heparin (x1) | 8: At Heparin (x1) |
| 3: Sığır Heparin (x 2) | 6: Kedi Heparin (x1) | 9: Tavuk Heparin (x0.5) |



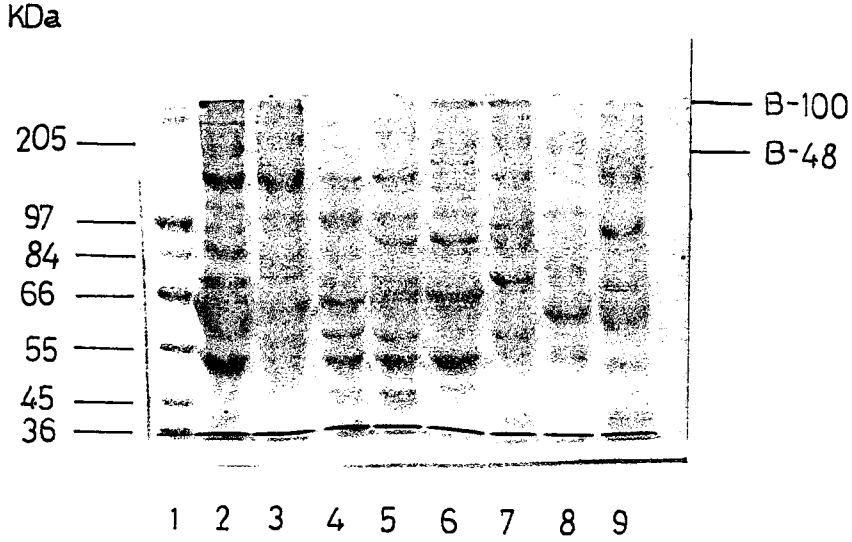
Şekil 58. İnsan ve Diğer Hayvan Türlerinin Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Serum β + pre- β Apolipoproteinlerinin SDS-PAGE (%7.5) Elektroforetogramları

- | | | |
|---------------------------|------------------|------------------|
| 1: Standart (yüksek M.W.) | 4: Koyun DS (x1) | 7: Köpek DS (x1) |
| 2: İnsan DS (x1) | 5: Keçi DS (x1) | 8: At DS (x1) |
| 3: Sığır Heparin (x 1) | 6: Kedi DS (x1) | 9: Tavuk DS (x1) |



Şekil 59. İnsan ve Diğer Hayvan Türlerinin Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Serum β + pre- β Apolipoproteinlerinin SDS-PAGE (%12) Elektroforetogramları

- | | | |
|--------------------------|------------------|------------------|
| 1: Standart (Düşük M.W.) | 4: Koyun DS (x1) | 7: Köpek DS (x1) |
| 2: İnsan DS (x1) | 5: Keçi DS (x1) | 8: At DS (x1) |
| 3: Sığır Heparin (x 1) | 6: Kedi DS (x1) | 9: Tavuk DS (x1) |

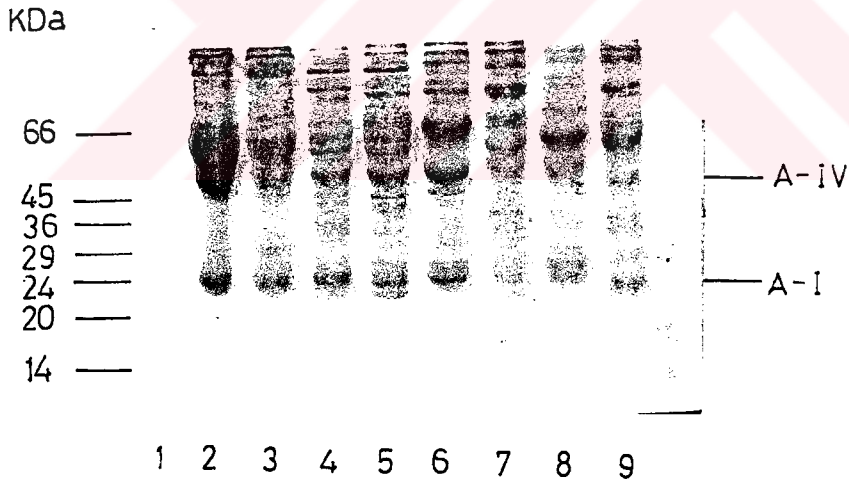


Şekil 60. İnsan ve Diğer Hayvan Türlerinin Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Serum β + pre- β Apolipoproteinlerinin SDS-PAGE (%7.5) Elektroforetogramları

1: Standart (yüksek M.W.)
2: İnsan NaphT (x1)
3: Sığır NaphT (x 1)

4: Koyun NaphT (x2)
5: Keçi NaphT (x2)
6: Kedi NaphT (x1)

7: Köpek NaphT (x1)
8: At NaphT (x1)
9: Tavuk NaphT (x1)

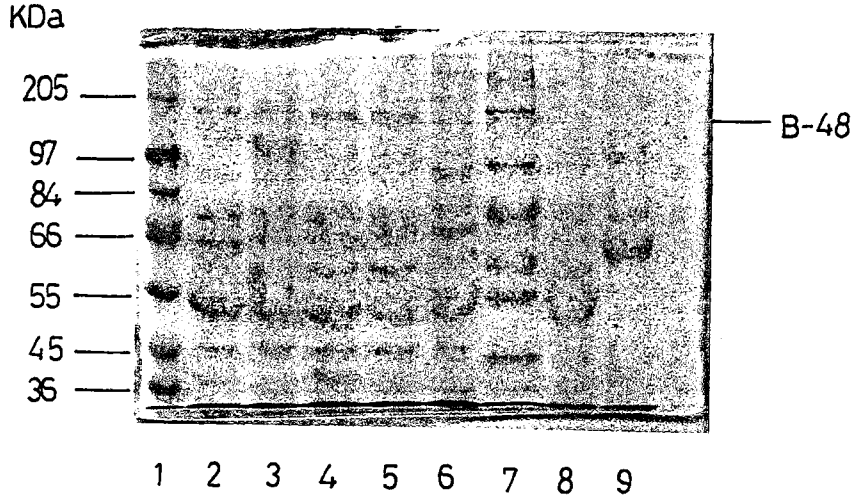


Şekil 61. İnsan ve Diğer Hayvan Türlerinin Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Serum β + pre- β Apolipoproteinlerinin SDS-PAGE (%12)Elektroforetogramları

1: Standart (Düşük M.W.)
2: İnsan NaphT (x1)
3: Sığır NaphT (x 1)

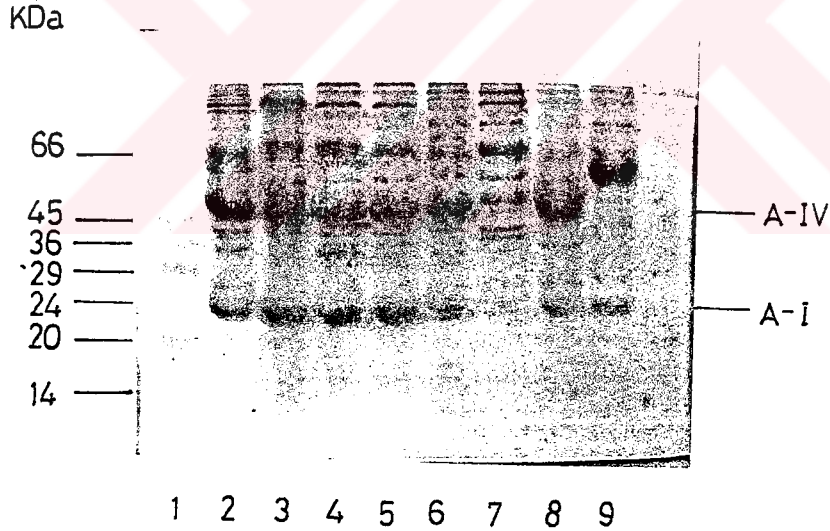
4: Koyun NaphT (x2)
5: Keçi NaphT (x2)
6: Kedi NaphT (x1)

7: Köpek NaphT (x1)
8: At NaphT (x1)
9: Tavuk NaphT (x1)



Şekil 62. İnsan ve Diğer Hayvan Türlerinin Polietilen Glikol (PEG) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Serum β + pre- β Apolipoproteinlerinin SDS - PAGE (%7.5) Elektroforetogramları

- | | | |
|----------------------------|-------------------|---------------------|
| 1: Standart (yüksek M.W.) | 4: Koyun PEG (x1) | 7: Köpek PEG (x1) |
| 2: İnsan PEG (x1) | 5: Keçi PEG (x1) | 8: At PEG (x0.5) |
| 3: Sığır PEG (x 1) | 6: Kedi PEG (x1) | 9: Tavuk PEG (x0.5) |



Şekil 63. İnsan ve Diğer Hayvan Türlerinin Polietilen Glikol (PEG) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Serum β + pre- β Apolipoproteinlerinin SDS - PAGE (%12) Elektroforetogramları

- | | | |
|---------------------------|-------------------|---------------------|
| 1: Standart (Düşük M.W.) | 4: Koyun PEG (x1) | 7: Köpek PEG (x1) |
| 2: İnsan PEG (x1) | 5: Keçi PEG (x1) | 8: At PEG (x1) |
| 3: Sığır PEG (x 1) | 6: Kedi PEG (x1) | 9: Tavuk PEG (x0.5) |

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Mecut çalışma, insan serum lipoproteinlerinin halihazırda kullanılan metotlara göre agaroz jel elektroforezinde separe edilmesiyle başladı. Agaroz jelde serum lipoprotein elektroforezinin sonuçlarının kağıt elektroforezinden üstün olduğu bildirilmiştir. Bu üstünlük, β fraksiyondan pre- β fraksiyonunun iyi bir ayırımından ve transparan jellerin elde edilmesinden ileri gelmektedir. Pre- β lipoproteinlerin azalan agaroz konsantrasyonuna bağlı olarak orjinden daha ileri göç ettiği ve β / pre- β ayırımının daha iyi olduğu ileri sürülmüştür (67). Yapılan denemelerde de bu açıkça görüldü. Artan jel konsantrasyonuna bağlı olarak β /pre- β bantları birbirine çok yakınladığı hatta ayırım yapılamadığı gözlemlendi (Şekil 8, 9). Ayrıca çok düşük konsantrasyonlu jellerin de kırılğan olmasından dolayı %0.8'lik jeller tercih edildi ve iyi bir separasyon sağlandı (Şekil 10).

Tampon solüsyonunun molaritesinin de migrasyonu ve lipoprotein bantları arasındaki separasyonun derecesini etkilediği kanıtlanmıştır (67). 0.1, 0.075 ve 0.05 M barbital tamponlar kullanıldığında 0.05 M'lık tampon ile daha iyi bant rezolüsyonunun sağlandığı görülmüştür (67). Yapılan çalışma da bunu doğruladı. pH da agaroz jel elektroforezde etkili bir faktördür. Genellikle pH 8.6 tamponlar kullanılmıştır. pH 7.0 de elektroforez ile HDL2 ve VLDL'in diğer plazma lipoproteinlerinden daha iyi separe edildiği ileri sürülmüştür (31). Fakat, mevcut çalışmada pH 8.6'da iyi bir separasyonun sağlandığı gözlemlendi.

Buna rağmen bazen aynı şartlar altında β /pre- β ayırımı tam olarak yapılamadı. Karşılaştığımız bu problem Contois (21) tarafından da düşündürücü bulunmuştur. Aç ve tok serumlar ile plazma üzerinde çalışılmış, yarı tok serumlarda daha iyi bir rezolüsyon gözlenmiştir. Bu da aç serumlarda artan serbest yağ asitlerine bağlı olarak polaritenin değişmesine bağlanabilir. ETDA'lı plazmadaki separasyon seruma göre daha zayıf bulunmuştur (Şekil 8, 9). Buna rağmen, β /pre- β rezolüsyonunun bazen değişken olmasının sebepleri araştırılmaya açıktır.

Hayvanlarda lipit transport sistemlerinin bilinmesi atherojenik besinlerle beslenen insanlarda lipit ve lipoprotein metabolizması için deneysel modeller olarak hayvan türlerinin kullanımını sağlamaktadır. İnsan beslenmesinde hayvan orjinli besin maddelerinin artan önemi yüzünden hayvanların beslenmesine dair ve onların lipit absorpsiyon ve transportunun şekillerine dair araştırmalara yönelinmiştir. Bu amaçla normal beslenme şartları altında mevcut türlerin bir kısmında temel lipoproteinlerin ve

apolipoproteinlerin kalitatif ve kantitatif özelliklerine ilişkin bilgi çok azdır (19). Aynı şekilde mevcut presipitasyon metotlarıyla çeşitli hayvan lipoprotein separasyonlarının bütün olarak karşılaştırmalı şekilde ele alındığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

At, plazma lipoproteinleri tanımlanan ve incelenen ilk memeli hayvandır. 1929'da at plazmasında sirküle olan lipit protein komplekslerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri tanımlanmıştır (19). Bazı primatlar dışındaki hayvanlarda da insanlardaki gibi kolesterol ve atherosklerozise predispozisyon arasında aynı ilişki gözlenmiştir. Şişmanlık, anoreksi ve ataksiye bağlı olarak atlarda hipertrigliseridemia tanımlanmıştır (76). Atlar HDL fraksiyonlarında total lipidlerin %76'sı gibi büyük bir porsiyonunu taşıdıkları için çoğu hayvan türlerine benzerlik gösterir. Diğer yandan insanlarda HDL, total lipitlerin sadece %35'ini taşır. Atların lipoprotein kompozisyonları yazarlar tarafından az çok farklılıklarla tanımlanmışsa da agaroz jel elektroforez ile α ve β mobiliteli 2 temel lipoprotein bandı içerdiği bildirilmiştir (8).

Deneysel olarak aç bırakılan normal ponilerde hipertrigliseridemia ve daha az olarak hiperkolesterolemia gözlenmiştir. Aç ponilerde görülen hiperlipoproteinemia insan türlerinde çok yaygın görülen form olan tip IV hiperlipoproteinemia'ya benzetilebilir.

Subakut ve kronik çayır tetanisi ve kolik hastalığı olan atlarda serum total lipit ve lipoprotein fraksiyonları çalışılmıştır. Normal atlarda olmayan pre- β lipoprotein fraksiyonunun tüm hasta gruplarda arttığı görülmüştür. α_2b lipoprotein oranı da kolik ve çimen hastalığında oldukça yükselmiştir. Tanımlanan değişikliklerin atlardaki yağ metabolizması bozuklukları, besin alımının azalması, kortizol ve katekolamin salınımı ve insülin direncini içine alan faktörler yüzünden olduğu düşünülmektedir.

Serum lipoproteinlerinin artan düzeyleri yağ metabolizması bozukluklarına işaret eder. Hiperlipoproteinemia at, mink ve tavşan gibi türlerde açlık sonucunda oluşmaktadır (8).

Deneysel olarak indüklenen karaciğer hastalıklı ponilerde serum lipid ve lipoprotein konsantrasyonlarındaki değişimler bildirilmiştir. Hepatosellüler hasar CCl_4 'ün ölümcül olmayan dozunun verilmesiyle oluşturulmuştur. Bir diğer grupta safra kanalı ligatüre edilerek tıkanma sarılığı meydana getirilmiştir. Elektroforetik ve ultrasantrifugal metotlarla, tıkanma sarılığı oluşturulan ponilerde VLDL ve LDL kolesterolünde artış ve HDL kolesterolünde azalış tespit edilmiştir (10). Lipoprotein

dağılımındaki benzer değişiklikler tıkanma sarılıklı ve ketozisli köpeklerde, ratlarda ve insanlarda da gözlenmiştir (10).

Atlarda görülen hiperlipemik durumlar diğer hastalıklar ya da durumlara bağlı olarak da görülür. Lipit metabolizmasındaki bozukluklar ilk olarak gastrointestinal bozuklukların bir varyetesi olarak hasta ponilerde 1969'da bildirilmiştir. Laktasyon sonundaki ve ilk laktasyondaki kısıraklarda hiperlipemi riski artmaktadır. Besin alımını deprese eden sekonder parazit enfestasyonu, gebelik, laktasyon, beslenme yetersizliği, transport yada diğer stres ve koma durumlarında da hiperlipemi görülmektedir. Lipoprotein profilindeki ilk değişiklikler VLDL miktarının artışına bağlı olarak agaroz jel elektroforezde artan bir pre- β bant olarak görülmektedir (89,90).

Mevcut çalışmada, at serum lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforezinde β ve α bantları gözlendi. Pre- β lipoprotein tespit edilemedi. Bir gecelik açlıktan sonra kan alınan ponilerde VLDL'in mevcut olmadığı bildirilmiştir (8, 62). Kan örnekleri de sabah erken saatlerde akşamdan beri yem yememiş atlardan alındığı için pre- β lipoprotein bulunmayışı bu konudaki mevcut literatürlerle uyumludur. Ayrıca şilomikronlar da belirlenemedi. Buna rağmen Bauer (12) agaroz jel elektroforezde pre- β lipoproteinlerin varlığından da söz etmiş, açlık ve lipoprotein metabolizmasında bozukluk yaratan durumlarda ise bu bandın arttığını bildirmiştir. Literatürler arasındaki bu farklılık beslenme şartlarına ve açlık süresine bağlı olabilir.

Ruminant lipoproteinleri üzerine sınırlı çalışma mevcuttur. Koyun, keçi lipoproteinlerine dair çalışmalar son yıllarda ortaya çıkmıştır. Koyun ve keçilerde HDL'in temel lipoprotein (Toplamın %80'i) sınıfını oluşturduğu tespit edilmiştir. Sığırlar lipoproteinleri için de aynı durum söz konusudur (19). Sığırdaki total serum lipidlerinin %1'den azının VLDL fraksiyonunda, ~% 26'sının LDL fraksiyonunda ve geriye kalan ~%73'lük kısmının HDL fraksiyonunda olduğu bildirilmiştir (92).

Ketozis'li ve süt yağı deprese edilmiş sığırlarda serum lipoproteinlerinde ciddi değişiklikler gözlenmiştir (29). Karaciğerinde yaygın fasciolasis lezyonları görülen ve belirgin olarak ikterik bir koyunda β ve pre- β pozisyonlarda tek bir bandın bulunduğu, ayrıca α lipoproteinlerin normale ve diğer lipoproteinlere göre düşük konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir (36). Malarial enfeksiyonlarda hipertrigliseridemia olduğu da bildirilmiştir (96). Anaplazma marginale enfeksiyonunda da sığırlarda α , sonra β lipoprotein fraksiyonunda azalış tespit edilmiştir. Elektroforezde serum lipoproteinlerinde normale göre boya yoğunluğundaki azalış sığırlarda total serum

lipidinde azalışa paralel olduğu ileri sürülmüştür. Enfekte sığırlarda önce α , sonra β fraksiyonun azaldığı bildirilmiştir (14).

Sığır serum lipoproteininin elektroforetik görünümü ortaya konulmuştur. Kağıt elektroforezinin kullanıldığı önceki çalışmaların bir kısmında sadece bir β bandı gözlemlenirken, bir kısmında da hem β hem de α bant gözlemlendiği bildirilmiştir (14). Sellüloz asetat kullanıldığında ise küçük bir pre- β bandının varlığından bahsedilmiştir (14). Güldür ve ark (36, 37) sellüloz asetat elektroforezinde sığır, koyun ve keçi'de β , pre- β ve α lipoproteinleri tespit etmişlerdir.

Mevcut çalışmada sığır, koyun ve keçi serum lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforezinde β ve α bandı gözlemlendi. At'da olduğu gibi pre- β bandı belirlenemedi. Mevcut bulgular Ferreri ve ark.(32) tarafından doğrulanmıştır. Sığır serumundan izole edilen lipoproteinler agaroz jel kolonlara uygulanmış ve moleküler boyuta göre ayrılmıştır. Kolondan %11'lik pik I, %6'lık pik II ve %83'lük pik III olmak üzere üç pik çıkmıştır. Pik I'in VLDL'e, pik II'nin LDL'e ve pik III'ün HDL'e karşılık geldiğini belirlemişlerdir. Bununla birlikte VLDL (pik I) ve LDL (pik II) lipoproteinlerin agaroz jel üstünde yaklaşık aynı pozisyonda göç ettiğini oysa insanda VLDL ve LDL'in 2 farklı bant (pre- β ve β) olarak separe olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuç da agaroz jel elektroforezde sığır serumunun insanda görülen 3 bandın aksine niçin 2 bant sergilediğini açıklamaktadır.

İnsan serumu lipoproteinlerinin elektroforezle belirgin bir şekilde separe edilmesine rağmen, Ferreri (32) kağıt, agaroz ve poliakrilamid gel elektroforezde (PAGE) sığır serum lipoproteinlerinin iyi bir separasyonunun elde edilemediğini ileri sürmüştür. Rat gibi diğer hayvan türlerinin de serum lipoproteinlerinin elektroforezde yeterli rezolüsyon sağlamadığı belirtilmiştir. Zayıf rezolüsyondan dolayı da insandakinin aksine VLDL ve LDL (pre- β ve β) ayırımının mümkün olmadığına ve agaroz jel filtrasyonun elektroforeze göre daha zahmetli olmasına rağmen sığır lipoprotein profilini başarılı bir şekilde sunmanın en iyi yolu olduğuna dikkat çekilmiştir.

Çalışmamızda da gerek at gerekse sığır, koyun ve keçi'nin serum lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforez ile separasyonunda insanla karşılaştırıldığında, yaklaşık 2 kat daha fazla serumun jele aplik edilmesine rağmen, lipoproteinler daha az boya alan silik bantlar halinde gözlemlendi. Az da olsa mevcut olan pre- β bandı gösterilemedi. Bu da yukarıda belirtildiği gibi zayıf rezolüsyona bağlı olabileceği gibi, Chapman'ın (19) belirttiği üzere sığır serumundaki 1.063 g/ml'den daha az dansiteli lipoproteinlerin yapı

ve dağılımının oldukça kompleks (heterojen) olmasına bağlı olabilir. VLDL'in (IDL'yi de içeren ve çok küçük bir fraksiyonu oluşturan) diğer memelilerde olduğu gibi triaçilgliserolden zengin olduğu, fakat ilaveten fosfolipit bakımından da zengin olduğu bildirilmiştir. Diğer yandan VLDL'in kolesteril esterinden fakir olmasından dolayı rat VLDL'ini andırdığı belirtilmiştir. Sığır LDL1'inin özellikle fosfolipit'den zengin (%41) ve bu nedenle benzer dansite aralığındaki insan fraksiyonuna tam olarak benzediği bildirilmiştir. Bununla beraber insan ve sığır LDL'leri benzer protein ve kolesteril ester içeriğine sahiptir. Rat HDL1'i ve sığır LDL'inin kimyasal kompozisyonunun karşılaştırılması aralarında göze çarpan bir benzerliği ortaya koymaktadır. Sığır VLDL, LDL1, LDL2 ve HDL'inin lipit esterlerinin yağ asidi kompozisyonu ruminantların sindirim fizyolojisinin bir yansımasıdır. Bu nedenle, sığır LDL1, LDL2 ve HDL'inin kolesteril esterleri dışındaki lipitlerinin muhtemelen rumende oluşan hidrojenizasyon nedeniyle insandakine göre daha doymuş lipidlerden meydana geldiği bildirilmiştir (19).

Sığır düşük dansiteli lipoproteinlerinin yapısal özelliklerinin insana göre daha farklı ve kompleks olduğu bir gerçek fakat bununla ilgili daha detaylı çalışmalar gerekmektedir. Daha ileri düzeydeki çalışmalarla sığır serum lipoproteinlerinin daha etkili separasyonları sağlanabilir.

At, sığır, koyun ve keçi'de β /pre- β ayırımının yapılamaması dışında fat red 7 B ile insana göre daha az boyanması mevcut hayvanların total lipoprotein, β lipoprotein ve kolesterol konsantrasyonunun insandan oldukça düşük olmasına bağlanabilir (84). Hayvan türlerinin serum lipid konsantrasyonları insandaki ile karşılaştırıldığında, tablo8'de de görüldüğü üzere insan total kolesterol ve triaçilgliserol konsantrasyonunun ruminantlardan çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu da bant yoğunluğunun azlığını açıklamaktadır.

Karnivorlar'da (kedi ve köpek) lipoprotein konsantrasyonunun belirlenmesine dair bilgilerin çoğu serum lipit analizlerine dayalıdır. HDL köpeklerde temel lipoprotein sınıfıdır (~%65) ve genellikle insandakinden fazladır. VLDL (çok az) konsantrasyonları düşüktür. Kedilerde LDL düzeyi (~%28) köpeğe göre daha fazladır (köpekde ~%20) ve HDL baskındır ve VLDL yok denecek kadar azdır (19, 46). Kanin LDL'inin insana göre daha yüksek triaçilgliserol ve daha düşük kolesteril içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir (46).

Kedilerde diabetes mellitus, hipotiroidizm, renal hastalıklar yada ilaçlarla oluşan bozukluklara bağlı olarak plazma lipoproteinlerinde değişimler meydana geldiği ileri

sürülmüştür. Ayrıca kedilerde kalıtsal hiperşilomikronemia bildirilmiştir. LPL aktivitesinin azaldığı, ilaveten şilomikronların arttığı, lipemia retinalis, periferel nöropatiler, granuloimler ve xanthoma görülebileceği ifade edilmiştir. Bu durum serum total kolesterolündeki ve triaçilgliserolündeki artışlarla dikkat çekmektedir. Agaroz jel elektroforezde LDL kolesterolünün artmasıyla bağlantılı olarak β bandında artış görüldüğü belirlenmiştir. Bu görünüm insanlardaki familial tip II hiperlipoproteinemiya benzerlik göstermektedir (11).

Açıklanamayan sebeplerden dolayı bazı kedilerde yoğun şilomikronemia'ya rastlanmıştır. Fakat klinik belirti göstermedikleri belirtilmiştir. 4 °C'de bir gece bekleyen plazmanın yüzeyinde kalın bir krema tabakası oluşur. Çoğu kedide VLDL'in hafif bir artışına bağlı olarak bulanık bir infranatan mevcut. Aç plazma örneklerinin elektroforetik görünümünde orjinde artan bir şilomikron bandı, pre- β pozisyonda çok belirgin bir VLDL bandı ve α pozisyonda azalan bir HDL bandının görüldüğü ileri sürülmüştür (46).

Kedi lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforezinde benzer bulgular bulundu. Kedi serum lipoproteinleri agaroz jel elektroforezde β ve α olmak üzere 2 band sergiledi. Fakat bir kedinin serum lipoproteinlerinin aynı şartlar altında elektroforetik analizinde, insana göre daha az yoğunlukta bir pre- β bandı tespit edildi.

4 kediden ayrı zamanlarda eter anestezisi altında alınan serumların hepsi de süt manzaralı yani triaçilgliserolden zengindi (hiperşilomikronemia ?). Bu sebepten dolayı kedi lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforezinde orjinde boyalı bir band olarak şilomikronlar göze çarpmaktadır. Kediler sokak kedileri olduklarından, beslenme şartları ve sağlık durumları kontrol altında değildi. Bu nedenle kedilerde sıkça görülen primer hiperşilomikronemia'nın mevcut olduğu yada kan alımından kısa süre önce beslendikleri düşünülebilir. Mevcut çalışmada tok durumda β / pre- β ayırımının insanda çok iyi yapılamadığı gözlendi. Kedilerde olduğu belirlenen pre- β bandının görülmeyişinin sebebi olarak bu durum düşünülebilir.

Köpekler spontan atherosklerozisin gelişimine dirençlidirler. Buna rağmen, köpekler insan atherosklerotik çalışmalar için bir model olarak kullanılır. Deneysel çalışmaların çoğu tür, yaş, cinsiyet ve beslenme durumunun belirlenmediği hayvanlar üzerinde uygulanmıştır. Lipit düzeylerinin hayvanların yaşıyla değiştiği bilinmektedir. Deneysel ve evcil köpekler arasında farklılık vardır, fakat türlerin etkisi bilinmemektedir.

Köpeklerin HDL düzeyi insanlardan yaklaşık 3 kat fazlayken, LDL düzeyi de insandakinin 1/3'ü kadardır (92).

Hiperlipidemi (kolesterol ve triaçilgliserol konsantrasyonlarının artması) köpeklerde tanımlanmıştır. Bu genellikle plazma lipoproteinlerinin metabolizmasındaki kalıtsal bir defektten ileri gelen primer hiperlipidemia yada sistemik bir hastalığa bağlı olarak sekonder hiperlipidemia'dır. Primer hiperlipidemi köpeklerde nadirdir. Çok yaygın görülen sekonder hiperlipidemia, hipotiroidizm, hiperadrenokortisizm, diabetes mellitus, nefrotik sendrom ve obstruktif sarılığa bağlı olarak oluşur.

Diabetik köpeklerin lipoprotein elektroforezinde yoğun boyanan bir β bandı (artan LDL'e paralel olarak) ve α bandı (artan HDL'e bağlı olarak) bildirilmiştir. Ayrıca VLDL konsantrasyonunda da artış belirlenmiştir. Hipotiroidizmli köpeklerde LDL ve HDL kolesterolünde artış görülmüştür. Bu kolesterol artışına bağlı olarak 1.006 g/ml'den daha az dansiteli fakat elektroforezde β pozisyonunda göç eden β -VLDL olarak isimlendirilen bir lipoprotein varlığına dikkat çekilmiştir. Hiperadrenokortisizm'li köpeklerde de plazma kolesterol ve LDL kolesterol konsantrasyonu artmıştır (7).

Normal köpek serum lipoprotein elektroforezinde β band LDL'i ve α band HDL'yi temsil eder. α bölgede çok yavaş göç eden bir band HDL1'dir. Deneysel olarak normal köpeklerin 1/3'ünde görülmeyen, fakat VLDL olabilen HDL'den daha yavaş göç eden bir pre- β bandı da bildirilmiştir (46).

Köpek serum lipoproteinlerinin yapılan agaroz jel elektroforezinde de literatürde (46) ifade edilenle paralel olarak 4 farklı köpekten alınan serumların elektroforezinde sadece 1 köpekde β , pre- β ve α bandı gözlemlendi. Diğerlerinde sadece β ve α bandı tespit edildi. Köpeklerden kan alınırken yaş, cinsiyet ve tür ayrılığı göz önüne alınmadı. Ama özellikle kanın aç karnına alınmasına dikkat edildi.

Evcil hayvanlar arasında lipoproteinlerin farklılaşmalarına dair karşılaştırmalı bilgiler mevcuttur. Plazma lipoproteinleri klasik olarak hidratize dansitelerine göre ve elektroforetik mobilitelerine göre (agaroz jel elektroforez) karakterize edilmektedir. İnsan plazma lipoproteinlerinin izolasyonu için elektroforetik şartların kedi, at ve muhtemelen sığır plazması için elverişli olduğu görülmüştür. Önceki çalışmalar köpek ve insan lipoproteinlerinin benzer dansiteye sahip olduklarından dolayı insan lipoproteinleri için geliştirilen metodolojilerin köpekler için de kullanılacağını öne sürmektedir (92), fakat daha sonra köpeklere direkt olarak uygulanabilir olduğunun belirsizliğinden bahsedilmiştir. Köpeklerin serum lipidlerinin ve lipoproteinlerin

dağılımları insandan farklıdır. Kedi'de de farklılıkların mevcut olduğu bildirilmiştir (11).

Kanatlı hayvanların lipoprotein dağılımlarına dair önemli ölçüde veri mevcuttur. Kanatlı lipoproteinlerine olan bu ilginin nedeni de hiperlipideminin, hiperkolesterolemianın ve lipoprotein (VLDL) sentezinin moleküler mekanizmasının çalışılmasında hayvan modeli olarak kanatlıların kullanılmalarıyla açıklanabilir.

Analitikal ultrasentrifügasyon metodu ile yumurtlayan tavukların serumundan VLDL ve HDL olarak 2 lipoprotein sınıfı izole edilmiştir. Horozlarda ve piliçlerde VLDL, muhtemelen LPL tarafından kan dolaşımından çabucak uzaklaştırıldığından dolayı mevcut değildir. Yumurtlamanın başlamasıyla VLDL'deki yoğun artış artan östrojen düzeyleriyle ilişkili olarak karaciğerde sentezin artmasının sonucudur. Yumurtlayan tavuklarda VLDL artmakta, HDL ise azalmaktadır (41).

Çalışmada, Broiler türü besi tavuklarının serum lipoproteinlerine bakıldığında 2 lipoprotein bandı görüldü. Tavuk serum lipoproteinlerinin agaroz jeldeki mobilitelerinin insan ve diğer hayvan türlerinden çok farklı olduğu dikkat çekti. Bu da kuşlardaki lipit transport sisteminin memelilerden farklı olmasına bağlıdır. Memelilerde, ekzogen yağ lenf aracılığıyla şilomikronlarda taşınır. Oysa tavuklarda şilomikronlar şekillenmez ve ekzojen yağ portal ven aracılığıyla VLDL'de (büyük VLDL yada portomikronlar) taşınır (41).

Tavuk serum HDL'inin %0.5'lik agaroz jelde albümini izleyen sonda göç ettiği, VLDL'in orjinden hemen sonra kısa bir mesafede göç ettiği ve LDL'in daha ilerde yer aldığı bildirilmiştir (41). İmmature tavuk yada horoz serumunda az yada hiç VLDL bulunmadığı ileri sürülmüştür. Yumurta üretiminin başlamasıyla VLDL'deki yoğun artışın ise östrojenin artan düzeyleriyle ilişkili olarak karaciğer tarafından sentezdeki artışın bir sonucu olduğu öne sürülmüştür. Bu nedenle serumda VLDL'in akümülyasyonunun yumurta sarısı üretimi için gerekli VLDL deposu olarak hizmet ettiğinden bahsedilmiştir (41).

Mevcut bilgilerin ışığında agaroz jel elektroforez ile separe edilen 2 bantdan birinin göç yerine göre pre- β (VLDL) ve diğerinin de α (HDL) olduğu belirlendi. Fakat β (LDL) fraksiyonu tespit edilemedi.

Yumurtacı Leghorn tavuklarda VLDL konsantrasyon artışına bağlı olarak düşük de olsa bir LDL'in varlığı yapılan diğer çalışmalarda tespit edilmiştir (1, 19, 41). Oysa mevcut çalışmada 6 haftalık Broiler piliçlerin serumları kullanıldı. Bu durumda azalan

VLDL konsantrasyonuna bağı olarak VLDL'den köken alan LDL konsantrasyonunun da azaldığı düşünülebilir. Bu nedenle elektroforezde β bandı tespit edilememiş olabilir.

İnsan ve çeşitli hayvan türlerinin normal lipoprotein dağılımları agaroz jel elektroforez ile ortaya konulduktan sonra, heparin/ $MnCl_2$, dekstran sülfat/ $MnCl_2$, sodyum fosfotungstat / $MgCl_2$ ve polietilen glikol ile serum $\beta + pre-\beta$ lipoproteinlerin presipitasyon metotları insan ve diğer hayvan türlerine uygulandı. Mevcut presipitasyon metotları insan lipoproteinleri için tasarlandığı için hayvan türlerine uygularken insanda kullanılan metotlardaki ayraç konsantrasyonu referans alınarak karşılaştırma yapıldı.

İnsanda tüm presipitasyon metotlarında da ilgili literatürlerin ışığında başarılı olarak $\beta + pre-\beta$ lipoproteinlerin separasyonu sağlandı.

Heparin- $MnCl_2$ ile presipitasyon, apolipoprotein B içeren lipoproteinleri ($\beta + pre-\beta$) plazmadan uzaklaştırmak için uzun süredir kullanılmaktadır (78). Lipit Araştırma Klinik Programı tarafından tavsiye edilen presipitasyon metodu Heparin- $MnCl_2$ 'ün kullanıldığı metottur (80).

Heparin- Mn^{+2} ile LDL ve VLDL'in presipitasyonunda bir takım problemlerin ortaya çıktığı öne sürülmüştür. Çünkü tüm heparin preparatları aynı etkiye sahip değildir ve bu nedenle heparin'in farklı bir üretimi kullanıldığında VLDL'in tam olmayan presipitasyonunun meydana geleceğinin göz ardı edilmemesi gerektiği bildirilmiştir. Bundan başka heparinin presipitasyon kabiliyetinin, heparinin miktarı ve biyolojik kaynağı değiştiğinde her bir yeni üretimin apoB içeren lipoproteinlerin maksimum presipitasyonunu temin etmek için standardize edilmesi gerektiği de ileri sürülmüştür (57).

Bu presipitasyon metodunun en yaygın kullanım amacı HDL kolesterol ölçümüdür. Bu amaçla serum $\beta + pre-\beta$ lipoproteinleri heparin ile çöktürülerek süpernatantda kalan HDL kolesterolü enzimatik yollarla tespit edilir (21). Buna karşın lipemik serumdan apo B içeren lipoproteinlerin nakli için heparin/ Mn^{+2} metodunun etkinliğinin düşük olduğu bildirilmiştir (25). 46 mmol/L Mn^{+2} 'in serum örnekleri için yeterli olmasına rağmen, 92 mmol/L'lik Mn^{+2} konsantrasyonunun plazma ve lipemik serumlar için elverişli olduğu ileri sürülmüştür (85). Çünkü EDTA'lı plazmada EDTA ile Mn^{+2} divalent katyonu şelat oluşturduğundan heparin- Mn^{+2} metodunda 2 kat daha fazla Mn^{+2} gerektirmektedir. Serum örneklerinde 92 mmol/L konsantrasyonunun kullanımının HDL'in bir miktar kopresipitasyonuna sebep olduğu, 46 mmol/L Mn^{+2} konsantrasyonunda ise bu kopresipitasyonun daha az olduğu bildirilmiştir (26).

Mevcut literatürlerin ışığında materyal olarak plazma yerine serum tercih edildiğinden 46 mmol/L $MnCl_2$ konsantrasyonu, 92 mmol/L $MnCl_2$ 'e tercih edildi. 1 gece 4 °C'de bekletilen süpernantlarda bulanıklık oluştu. Fakat bu bulanıklığın kısmen tam olarak presipite olmayan $\beta + pre-\beta$ 'dan ileri geldiği düşünülmektedir. Çünkü 1 gece 4 °C'de bekleme sonrası yapılan 2. bir santrifüj neticesinde çok az presipitat oluştu. Berrak süpernantın tekrar 1 gece 4 °C'de bekletilmesiyle bulanıklığın oluşması manganez oksit oluşumundan ileri geldiği görüşünü desteklemektedir (85).

İnsan serum $\beta + pre-\beta$ lipoproteinlerinin heparin ile çöktürülmesi Liquefine ticari preparatıyla etkili bir şekilde gerçekleştirildi. Presipitasyon sonrası β ve $pre-\beta$ lipoproteinlerin mobilitelerinin değişmesi, heparin/ $MnCl_2$ ile bu lipoproteinlerin kompleks teşkil ettiğini göstermektedir. Aynı şekilde artan ayıraç konsantrasyonlarında (x_2, x_3) α lipoproteinlerin de $\beta + pre-\beta$ fraksiyonuna dahil olduğu görülmektedir. Çünkü süpernantlarda azalan α bandına karşılık, presipitatlarda ayrı bir α bandı mevcut değildir. Fakat bunun yanında presipitatlardaki $\beta + pre-\beta$ bandının yoğunluğu artmakta, bu da kompleks oluşumunu doğrulamaktadır.

Koyun, keçi, kedi, köpek ve at serum lipoproteinlerinin heparin/ $MnCl_2$ presipitasyonu için insandaki ayıraç konsantrasyonunun aynısı $\beta + pre-\beta$ lipoproteinleri presipite etmede yeteriyken sığırdaki x_2 konsantrasyon tam bir presipitasyon sağladı. Koyun, keçi, köpek ve at'ın presipitasyon sonrası elektroforetogramları birbirine benzemektedir. Artan ayıraç konsantrasyonuna bağlı olarak presipite olan α lipoproteinler, $\beta + pre-\beta$ bandı ile birlikte presipite olarak tek bir band şeklinde görülmektedir. Sığır ve kedi'de ise artan ayıraç konsantrasyonuna bağlı olarak $\beta + pre-\beta$ lipoproteinlerle birlikte presipite olan α lipoproteinler ayrı bir bant halinde göç etmektedir. Bu farklılığın nedeni olarak, insan ve çeşitli hayvan türlerinin serum lipoproteinlerinin yüzde dağılımı arasındaki farklar ve lipoprotein partiküllerinin yüzey yüklerinin yoğunluğundaki farklılıklar gösterilebilir. İnsan ve çeşitli hayvan türlerinin serum lipoproteinlerinin yüzde dağılımlarına bakıldığında, $\beta + pre-\beta$ lipoprotein oranının insanda ~%70 iken sığırdaki ~%44, koyun ve keçide ~%22 civarındadır. Buna göre insan serumundaki $\beta + pre-\beta$ lipoproteinlerin çöktürülmesi için gerekli heparin/ $MnCl_2$ konsantrasyonunun sığır, koyun ve keçiden daha fazla olması gerekirdi. Oysa böyle bir durum söz konusu değildir. $\beta + pre-\beta$ lipoproteinlerin yüzey yüklerindeki farklılıklar ayıraç konsantrasyonundaki farklılıkların açıklanmasında daha

muhtemel gözükmektedir. Ayrıca serumun pH'sı ve iyonik güçteki değişiklikler bu farklılıkta rol alabilir.

Tavuk lipoproteinlerinin heparin/MnCl₂ ile presipitasyonunda insandan farklı olarak kullanılan ayıraç konsantrasyonunun (x1) yarısının (x0.5) β + pre- β lipoproteinleri presipite etmek için yeterli olduğu görüldü. Artan ayıraç konsantrasyonuna bağlı olarak (x2, x3) presipitatlarda silik de olsa α bandı ayrı bir band halinde göç etti. Dikkat çekici bir özellik gittikçe artan ayıraç konsantrasyonuna bağlı olarak β + pre- β bant yoğunluğunda bir artışın görülememesidir. Bu da x0.5 ayıraç konsantrasyonunun tüm β + pre- β lipoproteinleri presipite etmede yeterli olduğunu göstermektedir. Tavuk pre- β lipoproteinleri insan ve diğer hayvan türlerinin β + pre- β migrasyon bölgesinin daha gerisinde (katoda yakın) yer almaktadır. Bu farklı migrasyonun yük farklılıklarına ve kullanılan ayıraç konsantrasyonlarındaki farklılıklara bağlı olması muhtemeldir.

Yukarıda bahsedilen hayvan türlerinin heparin/MnCl₂ ile serum lipoproteinlerinin separasyonuna dair bilgiye rastlanılmadığı için karşılaştırma yapma imkanı olmamaktadır.

Dekstran sülfat (DS) heparin'in sentetik bir analogudur ve heparin-Mn⁺² ile iyi bir korelasyon sergilemektedir. Önceki araştırmacılar lipoprotein presipitasyonunun DS'in moleküler boyutunun bir fonksiyonu olduğunu gözlemlediler. Daha büyük DS molekülünün, lipoproteinleri presipite etmeye daha fazla eğilimli olduğu belirtilerek, 500.000 g/mmol DS preparatları kullanılarak elde edilen HDL kolesterolü, heparin-Mn⁺² ve ultrasentrifügasyon metodlarıyla karşılaştırarak hesaplanmıştır. Benzer şartlar altında lipoprotein seperasyonu için kullanılan bir diğer standart DS preparatının (M.A.15.000) LDL/VLDL'i tamamen presipite etmediği bildirilmiştir (87). Değişik moleküler ağırlıklı DS preparatlarının karşılaştırılmasından sonra, ya laboratuvarda sentezlenen yada ticari kaynaklardan elde edilen Mg⁺² ile kullanılan 50.000 daltonluk DS'in, heparin ve Mn⁺² ile elde edilene yakın separasyonlar sağladığı ileri sürülmüştür. Katyon olarak Mg⁺² seçilmiştir. Çünkü Mg⁺²'un enzimatik kolesterol ölçümlerini engellemediği kanıtlanmıştır. Lipoprotein presipitasyonunda Mg⁺²'a benzeyen Ca⁺² kullanılmamıştır. Çünkü, hipertrigliseridemik örnekleri separe etmede daha az etkili olduğu düşünülmüştür (87).

Moleküler ağırlığı 50.000 DS ve Mg⁺² ile presipitasyon metodunun, yukarıda tanımlandığı gibi heparin-Mn⁺² prosedürüyle yüksek oranda ilişkili sonuçlar verdiği

bildirilmiştir. DS prosedürünün, HDL'i presipite etmeden VLDL ve LDL'i heparin- Mn^{+2} metodundan daha iyi separe ettiği de bildirilmiştir (87).

Özet olarak genellikle daha büyük DS ve Mg^{+2} 'un daha yüksek konsantrasyonlarının daha çok lipoproteini presipite ettiği; tersine, moleküler ağırlığı 15.000 olan DS'in, tüm konsantrasyonlarının daha az lipoprotein presipite ettiği ileri sürülmüştür (87).

1970'de Burstein ve ark. (15) moleküler ağırlığı 15.000 DS ve $MnCl_2$ ile presipitasyonla lipoproteinleri separe etmek için bir prosedür tanımlamışlardır. Bu ayıraçların düşük konsantrasyonlarının, apo B içeren lipoproteinleri serumdan presipite ettiğini belirlemişlerdir. 15.000 moleküler ağırlıklı DS, lipoproteinlerin presipitasyonu için Burstein ve ark. (15) tarafından geniş çaplı kullanılmıştır ve bunun hem daha yüksek hem de daha düşük moleküler ağırlıklı DS'a göre daha elverişli olduğuna karar verilmiştir.

Diğer bir çalışmada, yüksek moleküler ağırlıklı DS'in ayıraç konsantrasyonlarının kritik olduğu ve yüksek DS ve Ca^{+2} konsantrasyonlarında HDL'in büyük bir kısmının presipitasyonunun gerçekleştiği bildirilmiştir. Oysa düşük moleküler ağırlıklı DS'in VLDL ve LDL'i selektif olarak presipite ettiği ileri sürülmüştür (95).

Ayrıca kan pıhtılaşma faktörlerinin DS / Mg^{+2} metodunun doğruluğunu etkileyebildiği, DS ile kan pıhtılaşma faktörlerinin ilişkisinin DS konsantrasyonunu azaltabileceği belirtilmiştir (26).

HDL kolesterol ölçümü için karşılaştırmalı bir metot olarak DS 50.000/ Mg^{-2} metodunun kullanılması tam bir geçerlilik kazanmamıştır. Doğruluk, lipemik serumlardaki presipitasyon kapasitesi, serum plazma farklılıkları ve kolesterol ölçümünde presipitasyon ayıraçlarının engeli gibi noktaların belirsizliği yüzünden bu sonuca varılmıştır. Bu metodun daha önemli bir dezavantajı sadece bir üretici firma tarafından üretilmesidir (26).

DS ile lipoproteinlerin separasyonunun çok basit bir prosedür olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte bu metodun birtakım komplikasyonlara sahip olduğundan söz edilmiştir : 1-Gerçek bir saf β -lipoprotein fraksiyonu elde etmenin mümkün olmadığı, 2- Presipitatin, tamamen α lipoproteinlerden yoksun olduğunun görülmesine rağmen, albümin bölgesinde hala küçük bir proteinin varlığı belirlenmiştir. Lipoprotein protein oranı çalışılacaksa DS ile presipite edilen lipoprotein daha ileri düzeyde saflaştırmaya maruz bırakması önerilmiştir (26).

Yukarıda da belirtildiği üzere DS ile presipitasyon metotları üzerine yapılan çalışmalar tezat sonuçlar içermektedir ve daha birçok çalışmayı gerektirmektedir. Mevcut çalışmada M.A 500.000 (%2) ve M.A.15.000 (%10) olan 2 DS preparatı da denendi. Hem presipitasyon sonrası elektroforetik separasyonunun iyi olmaması, hem de HDL kolesterolünün (15mg/dl) çok düşük olması nedeniyle M.A. 500.000 olan DS'in elverişli bir presipitasyon sağlamadığına karar verildi. M.A 15.000 olan DS ile ilgili literatürleri destekler nitelikte iyi bir separasyon elde edildi ve HDL kolesterol değerleri de (49mg/dl) normal sınırlarda tespit edildi. Bunun dışında M.A.50.000 olan DS preparatı kullanılmadığından presipitasyon etkinliği bakımından bir kıyaslama yapılamadı. Fakat yüksek moleküler ağırlıklı DS preparatından ziyade düşük moleküler ağırlıklı preparatın daha etkili bir presipitasyon sağladığı ileri sürülebilir. Katyon olarak Burstein ve ark.(15) belirttiği gibi Mn^{+2} kullanılmıştır. Her ne kadar Mn^{+2} bazı enzimatik kolesterol ölçüm yöntemleri ile etkileşim gösteriyorsa da diğer katyonlara göre (Mg^{+2} ve Ca^{+2}) daha aktif olduğu bildirilmiştir (56).

Agaroz jel elektroforetogramları açısından insan serum β + pre- β lipoproteinlerinin, DS (15.000) ile presipitasyonunun heparin/ $MnCl_2$ 'e göre daha iyi olduğu belirlendi. Çünkü DS ile presipitasyonda β + pre- β lipoproteinler artan ayıraç konsantrasyonuna bağlı olarak daha fazla presipite oldu. Heparin/ $MnCl_2$ metodunda β + pre- β lipoproteinler daha diffüz bant meydana getirirken, DS'da tam olarak ayrılmasa da β ve pre- β ayırımını (x0.5) ve diffüz de olsa bir α bandı görmek mümkündür (x2, x3 konsantrasyonda). Fakat heparinde olduğu gibi artan ayıraç miktarına bağlı olarak lipoproteinlerin polaritesinin ve göç özelliklerinin değiştiği, x0.5 konsantrasyonda daha belirgin olarak β ve pre- β band ayırımının olmasına karşın x1, x2, x3 ayıraç konsantrasyonlarında tek bir bant olmasından anlaşılmaktadır.

DS ile presipitasyonda sırasıyla, sığır, koyun, keçi, kedi, köpek, at ve tavuk serum β + pre- β lipoproteinleri insan için kullanılan ayıraç konsantrasyonunda (x1) presipite oldu. Ayrıca β + pre- β ve α lipoprotein ayırımı yapıldı.

Nihayetinde DS ile presipitasyonda insan ve diğer hayvan türlerinde aynı ayıraç konsantrasyonu (x1) tam bir presipitasyon sağladığı için modifikasyona gerek kalmadan hayvan türleri için kullanılabilirliği düşünülmektedir.

DS/ $MnCl_2$ ile presipitasyon sonuçlarının, agaroz jel elektroforezdeki separasyon etkinliğinin karşılaştırılmasının mümkün olduğu verilere rastlanılmamıştır.

Apo B-100 içeren lipoproteinler (LDL ve VLDL) proteoglikanlara (PG) yada glikozaminoglikanlara (GAG) bağlandığı zaman bu moleküllerin hareketinin engellendiği kanıtlanmıştır. Heparin bir GAG ve dekstran sülfat'da heparin analogu olduğu için LDL ve VLDL ile oluşturdukları kompleksleri bozmanın oldukça zor olduğu bildirilmiştir. Serbest PG'ların yada GAG'ların çok negatif yüklü moleküller olduğu için jelde çabuk hareket ettikleri ve ileri doğru gittikleri bildirilmiştir. LDL-PG yada LDL-GAG ilişkilerinin elektrostatik etkileşiminin genellikle düşük tuz konsantrasyonlarında daha güçlü bağlanmaya sebep olduğu ileri sürülmüştür. Oluşan komplekslerin elektroforetik göç boyunca bir bant olarak devam ettiği ve kompleksin dissosiasyonunun oldukça zor olduğu da belirtilmiştir (17). İleri sürülen bu görüşleri doğrular nitelikte, insan ve diğer hayvan türlerinin serum β + pre- β lipoproteinlerinin heparin ve DS ile presipitasyonu neticesinde elde edilen presipitatların dissosiasyonunda zorluklarla karşılaşıldı. Lipoprotein-polianyon-divalent katyon arasındaki kompleksi bozmak, β ve pre- β lipoproteinleri elektroforetik olarak daha iyi separe etmek amacıyla yüksek tuz konsantrasyonları ; 3M NaCl (68), NaCl + MnCl₂ (55) NaCl + sodyum sitrat (6) kullanıldı. Sodyum sitrat ve NaCl ile presipitatlar kısmen de olsa diğerlerine göre daha iyi çözüldü. Çözünen presipitatın NaCl, Sodyum azid ve Na₂EDTA karışımına karşı bir gece dializ edilmesiyle sodyum sitrat, Mn⁺² in presipitatdan uzaklaştırılması ile lipoprotein-polianyon-divalent katyon kompleksinin tam olmasa da bozulduğu elektroforetik separasyon ile ortaya konulmuştur. Heparin-polianyon kompleksinin DS'a göre daha zor bozulduğu elektroforetik separasyonda tespit edildi.

İlaveten elektroforez esnasında komplekslerin dissosiasyonu olduğu takdirde serbest kalan PG'ların ve GAG'ların, serbest PG yada GAG'lardan daha yavaş göç ettikleri de bildirilmiştir (17). Heparin ve dekstran sülfat presipitatlarının agaroz jelde ilerlemesi sırasında albümine bağlı olarak giden serbest yağ asitlerinin önünde göç eden boya almayan bir izin varlığı belirlenmiştir. Bunun da serbest kalan heparin ve dekstran sülfattan ileri geldiği düşünülmektedir.

Günümüzde HDL kolesterol analizi için Avrupa'da çok sıkça kullanılan metot fosfotungstik asit (PhT) / MgCl₂ ile apo B içeren lipoproteinlerin presipitasyonudur. Presipitasyon sonrası süpernatant'da HDL-kolesterolün enzimatik analizi yapılır. PhT / MgCl₂, HDL'i çok az miktarda kopresipite eder. Hipertrigliseridemik serumlarda apo B içeren lipoproteinlerin tam bir presipitasyonu için de kullanılabilir. Bununla birlikte bu metodun bir dezavantajı, örneğin presipitasyon ayırıcına olan oranının (10/1)

uygun olmamasıdır. Diğer dezavantaj, PhT / MgCl₂ içeren ayıraç karışımının stabil olmamasıdır. Çünkü uzun süren depolanma sonrası izopolitugstik asit şekillendiği bildirilmiştir (4) Diğer yandan Lopes-Virella (57) tarafından PhT-Mg⁺² metodunun pratik 2 avantajının bulunduğu belirtilmiştir. Bunlar : 1) Sodyum fosfotungstatın solüsyonlarının çok stabil olması, 2) Üretilen sonuçların altı ay kadar aynı solüsyonu kullanarak elde edilebilmesidir.

Sodyum fosfotungstat (NaphT) ve Mg⁺², VLDL ve LDL'in selektif presipitasyonunda heparin-Mn⁺²'a bir alternatif olarak kullanılmaktadır.

Heparin-Mn⁺² da kullanılan presipitasyon prosedürlerinin tersine NaphT-Mg⁺² prosedürü enzimatik kolesterol ayıraçlarının varlığında pseudocholesterol (yalancı kolesterol) bulanıklığı üretmediği, NaphT ve MgCl₂'ün enzim reaksiyonlarını inhibe etmediği ve de değiştirmedeği tespit edilmiştir (77).

Yapılan çalışmada, insan serum β + pre- β lipoproteinleri NaphT / MgCl₂ (pH 7.4) (88) ile phT / MgCl₂ (pH 2.5) (37) 'dan daha iyi presipite edildi. pH 2.5 olan prosedür ile elde edilen HDL kolesterolü 13mg/dl iken, pH 7.4'ün süpernatant HDL kolesterolü 35 mg/dl olarak tespit edildi. Hem presipitatların elektroforetik olarak daha iyi göç etmesi hem de HDL kolesterolünün doğru değer vermesinden dolayı pH 7.4 olan prosedürle yapılan presipitasyon tercih edildi. Bu bulgu da NaphT'in pH'sının LDL ve VLDL'in tamamen presipite olması için 7.6 dan daha düşük olması gerektiğinin ileri sürüldüğü literatürle (57) uyum içindedir .

Artan ayıraç konsantrasyonuna bağlı olarak β + pre- β bandıyla birlikte presipite olan α lipoproteinler ayrı bir band halinde göç etmektedir.

Sığır ve diğer hayvan türlerinin serum β + pre- β lipoproteinlerinin NaphT ile presipitasyonu da insandaki ayıraç konsantrasyonunda (x1) gerçekleştiği ve artan ayıraç konsantrasyonuna bağlı olarak α lipoproteinlerin β + pre- β lipoproteinlerden ayrı, fakat biraz diffüz olarak göç ettiği gözlemlendi.

Koyun ve keçi lipoproteinleri de NaphT ile presipite edildi ve birbirinin aynı elektroforetik sonuçlar sergilediler. Her 2 türde de β + pre- β lipoproteinleri çöktürmek için insandaki ayıraç konsantrasyonunun 2 katı (x2) tam bir presipitasyon sağladı.

Güldür ve ark. (37) tarafından insan β + pre- β lipoproteinlerinin çöktürülmesi için kullanılan metotda öngörüldüğü üzere 0.56 μ mol /25 μ mol PhT / MgCl₂ yeterli iken keçi serumunda β + pre- β 'yı çöktürmek için insan serumu için gerekli olan miktardan en az 3 kat fazla ayıraç gerekli olduğu bildirilmiştir. Keçi lipoproteinleri

kullanılmışsada gerek sığır gerek koyun lipoprotein kompozisyonu keçininkine benzediği için söz konusu farklılıkların sığır ve koyun için de düşünülebileceği ileri sürülmüştür. Bu farklılık PhT (pH 2.5) metodunun kullanılmasına ve presipitatların pH'sının presipitasyon sonrası pH 7-8'e ayarlanmasına bağlı olabileceği gibi, presipite edilen lipoproteinlerin sellüloz asetat elektroforez ile separe edilmesine de bağlı olabilir. Keçi lipoproteinlerinden yola çıkılarak yapılan genellemeye koyun dahil olurken, sığır lipoproteinleri için aynı genelleme mevcut çalışmada yapılamadı.

Güldür ve ark. (37) tarafından yapılan aynı çalışmada keçi serumunda β ve pre- β lipoproteinlerin çöktürülmesi için gerekli PhT / $MgCl_2$ miktarının insan serumunda aynı amaç için gerekenden yaklaşık 3 kat daha fazla olmasının nedeni olarak hayvan serumunda insan serumundakinin aksine yüksek dansiteli (α) lipoproteinlerin konsantrasyonlarının düşük dansiteli lipoproteinlerden (β ve pre- β) daha çok olmasının gösterilmesinin zor olduğu ileri sürülmüştür. Çünkü aksi takdirde keçi serumunda β ve pre- β lipoproteinleri çöktürmek için gerekli PhT / $MgCl_2$ miktarının insan serumunda aynı amaçla kullanılan miktardan daha az olması gerektiği bildirilmiştir. Söz konusu farklılığı insan ve keçi serumundaki total lipid farklılığı ile açıklamak da pek mümkün gözükmemiştir. Çünkü PhT / $MgCl_2$ presipitasyon metodunun lipemik serumlarda dahi (10.26 $\mu\text{mol/L}$ triaçilgliserol konsantrasyonuna kadar) β ve pre- β lipoproteinleri tam olarak çöktürdüğü bildirilmiştir.

Rat şilomikronları ile yapılan bir çalışmada, şilomikronların heparine bağlandığı, oysa nöyraminidaz ile muamele edilerek sialik asitleri (nöyraminik asit) uzaklaştırılmış şilomikronların heparine bağlanmadığı bildirilmiştir. Bundan, lipoproteinlerin (apolipoprotein) karbohidrat gruplarının polianyonlara bağlanmada rol oynayabilecekleri anlaşılmaktadır. Buradan hareketle, insan ve keçi apolipoprotein-B içeren lipoproteinlerinin farklı konsantrasyonlardaki PhT / $MgCl_2$ ile presipite edilebilmesi muhtemelen insan ve keçi lipoproteinlerinin farklı konsantrasyon ve/veya kompozisyonda şeker grupları içermeleriyle açıklayabileceği, ancak bu konuda yapılacak daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu öne sürülmüştür.

Bu görüşe ilaveten lipoprotein-NaphT / $MgCl_2$ kompleksinin oluşumuna dair şu görüş de mevcuttur : divalent katyonların (Mg^{+2}) LDL-fosfolipidleri ve polianyon arasında bir köprü oluşturduğu bildirilmiştir. NaphT ve $MgCl_2$ 'ün serum yada plazmaya ilave edilmeden önce karıştırıldığında VLDL ve LDL fraksiyonlarının tam olmayan presipitasyonunun şekillendiği tespit edilmiştir. NaphT ve $MgCl_2$ 'in ilave edilme

sirasının ise VLDL ve LDL'in presipitasyonunu etkilemediği belirlenmiştir. Önceden karıştırılan polianyon ve divalent katyonun LDL fosfolipidleriyle reaksiyon vermeyecek stabil bir matriks oluşumuna yol açtığından bahsedilmiştir. Böylesi matrikslerin formasyonunun, lipoproteinlerle interaksiyon için polianyonların konsantrasyonunu ve elverişli divalent katyonları azalttığı bulunmuştur. LDL'in protein kısmının çözünmeyen komplekslerin formasyonu için esansiyel olmadığı da bildirilmiştir. Çözünmez LDL-divalent katyon-polianyon komplekslerin LDL'deki fosfolipit aracılığıyla oluştuğu ileri sürülmüştür. Muhtemelen, polianyonların ve divalent katyonların benzer bir mekanizmayla VLDL ve HDL ile etkileşim gösterdiği de ileri sürülmüştür (57).

NaphT / MgCl₂ (pH 7.4) ile presipitasyonda koyun ve keçi lipoproteinlerinin presipitasyonu hariç insanda kullanılan prosedürdeki ayıraç konsantrasyonunun (x1) diğer hayvan türleri için de yeterli olduğu tespit edilmiştir.

PhT ve Mg⁺² kombinasyonunun değişken sonuçlar verdiği de bildirilmiştir. PhT / MgCl₂ presipitasyonu ile lipoprotein separasyonunun ayıraç konsantrasyonlarına ve ısıya daha duyarlı olduğu, bu nedenle heparin-Mn⁺² ve DS-Mg⁺² prosedürleri ile elde edilenden daha az doğru sonuç verdiği de ileri sürülmüştür (87). Bunun yanında uygulamanın kolay olması, fazla işlem gerektirmemesi bu metodu elverişli kılmaktadır. Ayrıca son yıllarda presipitasyon basamağı kullanılmadan direkt HDL kolesterol ölçümü yapılmaktadır. Fakat ayıraç fiyatlarının çok pahalı olmasından dolayı alternatif olarak ve en az direkt HDL kolesterol metodu kadar iyi sonuçlar veren NaphT/MgCl₂ metodu tavsiye edilmektedir (27).

Poliyeten glikol (PEG) bir polimerdir ve suyun yapısını önemli ölçüde bozar. Suya bağlanma kabiliyeti yüksektir. Aküöz fazın polaritesini azaltır ve nisbeten yüksek bir ozmotik basınç oluşturur. Poliyeten glikol, protein, lipozom ve eritrosit yüzeylerinden hariç tutulur. Su yapısındaki bu etkileri ve partikül yüzeylerindeki öncelikli hidrasyonun sonucunda makromoleküller özellikle lipozomlar, virüsler ve lipoproteinler gibi daha büyük partiküller bir araya toplanırlar. Yüzeylerin bu öncelikli hidrasyonu muhtemelen 2 mekanizma tarafından oluşturulur : 1) PEG ve su moleküllerinin çok farklı büyüklüklerde olması nedeniyle PEG molekülünün sterik olarak bu partiküllere dahil edilmemesi, 2) Su ve PEG molekülünün yüzeyindeki polar gruplarla etkileşim için yarışması. PEG'ün LDL yüzeyi ile etkileşime girmek için zayıf bir eğilim göstermesi, LDL partiküllerinin yaklaşmasına ve bu arada çekim kuvvetlerinin ortaya çıkmasına yol açar. PEG'ün ozmotik basıncı artırması partiküllerin

bir araya gelmesini kolaylaştırır. Bu şekilde serumdan farklı lipoprotein sınıfları presipite edilir. Yüksek konsantrasyonlu LDL düşük konsantrasyonda PEG ve küçük partiküllü HDL daha yüksek konsantrasyonda PEG ile presipite edilir. Ancak PEG ile lipoprotein presipitasyonunun mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır (2).

Son konsantrasyonu 100 g / L (pH 10) PEG metodu kullanıldığında pH10'un lipoprotein presipitasyonunu inhibe ettiği ve önceki metodlarla karşılaştırıldığında daha yüksek ayıraç konsantrasyonlarını gerektirdiği bildirilmiştir (88). PEG 6000 %3, %6, %9 ve %12'lik konsantrasyonlarda da presipitasyonda kullanılmıştır (83). %12'lik PEG'deki HDL kolesterol değeri diğer prosedürlerde tanımlanan HDL kolesterol konsantrasyonlarıyla uyumlu bulunmuştur. PEG %12'nin kullanımı LDL+VLDL'in presipitasyonunda tavsiye edilmiştir. %13'lük (w/v) PEG ile tek bir presipitasyonun total HDL'in belirlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. %13'lük PEG solüsyonunun, daha küçük ve daha az hidrofobik apoE den zengin HDL'i, HDL'i ve apo E den fakir HDL'i süpernatantta bırakarak VLDL ve LDL'i presipite ettiği ileri sürülmüştür (20). Diğer yandan DS, NaphT ve heparin gibi polianyonları içeren ticari ayıraçların apoB içeren lipoproteinlerle birlikte apoE'den zengin HDL'i de presipite ettikleri bildirilmiştir. Bu nedenle, gerçek total HDL kolesterol konsantrasyonunun en iyi %13'lük PEG ile belirlenebileceği öne sürülmüştür (20).

Mevcut çalışmada da , %12.6'lık (M.A 20.000) PEG'den ziyade % 13'lük (M.A 8000) PEG tercih edilmiştir. (İlgili literatürlerde PEG 6000 olarak geçen PEG yeni üretimde PEG 8000 olarak geçmektedir) Çünkü düşük moleküler ağırlıklı PEG, yüksek moleküler ağırlıklı olandan daha iyi bir presipitasyon sağlamıştır. Düşük konsantrasyonlu PEG'ün daha yüksek LDL konsantrasyonlarını presipite ettiğinin bildirilmesine rağmen, düşük moleküler ağırlıklı yada yüksek moleküler ağırlıklı PEG'ün presipitasyon etkinliği açısından bir karşılaştırmaya rastlanılmamıştır.

PEG %8-15 lik konsantrasyonlarının denendiği ve agaroz jelde presipitat ve süpernatantların elektroforez yapıldığı bir çalışmada (20); presipitatta %8'den itibaren α bandı görülmezken, süpernatantta %8 ve %9 da β bandı görülmüş, ilerleyen konsantrasyonlarda β bandına rastlanılmamıştır. Bu da yapılan çalışmada %13'lük konsantrasyonunun seçilmesinde etkili olmuştur.

1976 da, Viikari ve ark (83) LDL ve VLDL için bir presipitasyon ayırıcı olarak PEG 6000 içeren bir separasyon metodunu öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte, bu metodun başkaları tarafından kullanılmasında birbirini tutmayan sonuçlar ortaya

çıkmıştır. Bu sebepten dolayı, Izzo ve ark. (44) tarafından yapılan araştırmada presipitasyon ayırıcının konsantrasyonu, ortamın pH'sı, presipitasyon ve santrifügasyon ısı ile süresi ve PEG 6000 ile presipitasyon sonrası HDL kolesterolünün ölçümünde kullanılan farklı partiler halinde üretilen PEG çalışılmıştır. Hem PEG konsantrasyonunun hem de presipitasyon ortamının pH'sının kritik faktörler olduğu, fakat presipitasyon ve santrifügasyon ısı ile zamanın ve PEG'ün farklı üretimlerinin önemli olmadığı bulunmuştur. PEG 100g/L (pH10) ile tekrarlanabilen sonuçlar elde edilebildiğini, ultrasantrifügasyonla yada heparin-Mn⁺² presipitasyon ile separasyonla elde edilene tam olarak karşılık geldiğini tanımlamışlardır (44).

PEG'ün kullanımını reddeden çalışma da mevcuttur (87). Çünkü Viikari (83) metodu'nun LDL'in presipitasyonu için gerekli olandan çok az yüksek konsantrasyonlardaki PEG'ün HDL'i ve diğer plazma proteinlerini kolayca presipite edeceği ifade edilmiştir. Bunun için örneklerde lipoproteinlerin ve diğer proteinlerin konsantrasyonu düşük olduğunda PEG metodunun daha az spesifik olabileceği ileri sürülmüştür. Bu çalışmada yukarıdaki ifadeyi doğrulayacak tarzda sonuçlar bulundu. Presipite edilen β + pre- β lipoproteinlerin SDS-PAGE elektroforezinde diğer presipitasyon yöntemlerine göre daha fazla proteininin mevcudiyeti tespit edildi. Bu da PEG'ün lipoproteinlerle beraber diğer plazma proteinlerini de presipite ettiği görüşünü desteklemektedir.

Viikari'nin (83) 1976 da önerdiği ve müteakiben diğer araştırmacılar tarafından modifiye edilen PEG 6000 prosedürüyle LDL ve VLDL' in presipitasyonu sonrası HDL kolesterolünün değerlendirilmesi polianyonlar ve divalent katyonları içeren metotlarla karşılaştırıldığında büyük ölçüde elverişli bulunmuştur. Warnick ve ark. (88) bu metodun ultrasantrifügasyonla yada heparin-Mn⁺² ile, heparin-Ca⁺² ile yada fosfotungstat-Mg⁺² ile presipitasyondan daha düşük değerler verdiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte onlar da Viikari tarafından ilk olarak önerilen PEG konsantrasyonunu kullanmışlardır. PEG 100g / L (pH 10)'da β lipoproteinlerin tam bir presipitasyonuna erişilmesinin muhtemel olduğu belirtilmiştir. PEG 100g/L pH10'un ultrasantrifügasyon ve heparin-Mn⁺² (46 mmol/L) metodu ile uyumlu olduğu ileri sürülmüştür. Heparin-Mn⁺² (92mmol/L) metoduyla elde edilen değerlerin PEG metoduna göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. PEG metodunun heparin-Mn⁺² metodundan üstünlükleri ise şöyle sıralanmıştır: 1) Farklı PEG üretimleri farklı sonuçlar vermez. 2) Santrifügasyon ısı sonuçları etkilemez. 3) Berrak süpernatantlar elde edilebilir (hatta eğer serumun triaçilgliserol içeriği çok yüksekse dahi) ve daha ileri derecede işlemler gerektirmeden

kullanılabilir. HDL kolesterolü ultrasantrifügasyonla elde edilene karşılık gelen bir değer vermiştir.

Mevcut çalışmada PEG 100g/L (pH10) (88) metodu da denendi ve %13 PEG (20) presipitasyon metodunun daha elverişli olduğuna karar verildi. Elektroforetik olarak %13'lük PEG daha iyi bir separasyon sağladı. Fakat HDL kolesterol değerleri açısından önemli bir fark görülemedi (sırasıyla 40mg/dl ve 35mg/dl).

PEG presipitasyon diğer presipitasyon metotlarına bir alternatiftir. Metot çabuk ve basittir: santrifügasyon süresi ve ısısından etkilenmez. PEG'in daha düşük konsantrasyonları kullanıldığında mevcut farklılıkların aşağıdaki faktörlerdeki değişimlere bağlı olduğu ileri sürülmüştür: 1) Solüsyon pH'sı 2) Plazma proteinlerinin konsantrasyonu 3) PEG 6000'in orjini ve 4) Kullanılan sistem : Kağıt elektroforezi kullanıldığında lipoproteinlerin küçük miktarlarını belirlemek için yeterince duyarlı olmamaktadır (83).

PEG solüsyonunun viskozitesi PEG 'ün HDL kolesterol analizi için kullanılmasını zorlaştırmaktadır (26).

PEG 6000 metodu karşılaştırma amacıyla elverişli bir metot olarak ortaya çıkmıştır. Çünkü, a) Ultrasantrifügasyon/heparin presipitasyon metoduyla mükemmel uyumludur. b) Dansite-gradient ultrasantrifügasyonla iyi uyumludur. c) Lipemik örneklerde etkili presipitasyon sağlar (27).

Optimize fosfotungstat ve PEG metodunun HDL kolesterol analizi için en iyi metotlar olduğu belirtilmiştir (25). PEG metodunda PEG'ün kaynağının, serumun tazeliğinin ve pH'nın doğruluğunun az da olsa etkili olduğu kanıtlanmıştır. Diğer presipitasyon metotlarının da serumun tazeliği yada karışımın pH'sıyla etkilendiği ileri sürülmüştür. PEG metoduyla EDTA'lı plazmalarda bilinmeyen sebeplerden dolayı hafifçe düşük değerler elde edildiği de buna eklenmiştir (25).

Yapılan çalışmada insan serum $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinleri PEG ile presipite edildi. Presipite olan β ve $\text{pre-}\beta$ lipoproteinlerinin ayrı bantlar halinde göç ettiği görüldü. Bu görünüm hiç bir presipitasyon metodunda elde edilemedi. Presipitasyon sonrası dahi β ve $\text{pre-}\beta$ ayırımının yapılabilmesi PEG'ün lipoproteinlerin yük dağılımlarını (polaritesini) bozmadığını göstermektedir. Lipoproteinlerin mobilitesi de presipitasyona bağlı olarak çok az değişti (anoda doğru). Artan ayıraç konsantrasyonuna bağlı olarak $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinlerin yoğunluğunda bir değişim olmadığı gibi α lipoproteinler de görülmedi. Süpernatantlarda artan ayıraç konsantrasyonuna paralel

olarak azalan bir α lipoprotein bandının görülmesine rağmen bu aldatıcıdır. Çünkü PEG prosedüründe (%13) ilave edilen ayıraç örnek oranı 1/1 (v/v) dir. Ayıraç konsantrasyonu arttırıldığında (x2, x3) 2/1, 3/1 şeklinde ilave edilen ayıraç miktarı arttırıldı. Böylece süpernatantlar giderek dilüe oldu. Artan ayıraç miktarına bağlı olarak hacmin de artması etkili bir konsantrasyon artışı sağlamadı. Her ne kadar tavuk hariç (tavukta x0.5 konsantrasyonda) kullanılan prosedürdeki miktarla (x1) etkili bir presipitasyon sağlanmış görünse de ileriye dönük daha iyi planlanmış çalışmalara gerek vardır.

İnsan lipoproteinlerinin apolipoproteinleri geniş ölçüde çalışılmışken, hayvanlara ait çok az çalışma mevcuttur.

Sığır HDL apolipoproteinleri çalışılmıştır ve insandakine karşılık gelenden daha az kompleks olduğu, oysa köpeğin HDL apolipoproteinlerine benzediği bildirilmiştir. Sığır HDL'inde insan apo A-I'ine analog bir apolipoprotein (M.W. 27 KDa) mevcudiyetinden bahsedilmiştir (19). Oysa sığır düşük dansiteli lipoproteinlerinin (LDL ve VLDL) yapı ve dağılımının oldukça kompleks olduğundan bahsedilmiş ve apolipoprotein kompozisyonuna dair kesin bir bilgiye rastlanılmamıştır (19).

Fosfotungstat/MgCl₂ presipitasyonu sonrası SDS-PAGE ile insan ve keçi $\beta + pre-\beta$ ve α lipoproteinlerinin apolipoprotein kompozisyonu gösterilmiştir. İnsan $\beta + pre-\beta$ lipoprotein fraksiyonunda en büyük moleküler ağırlıklı apolipoproteinlerin apo B olduğu, α fraksiyonda apo B'nin bulunmadığı bildirilmiştir. Keçi $\beta + pre-\beta$ ve α lipoprotein fraksiyonlarında apoAI ve C'nin bulunmasına karşın insandakinin aksine apo AIV ve E'nin belirgin olmadığı gösterilmiştir. İnsandaki apo B'ye benzer mobiliteye sahip bir protein bandının keçi $\beta + pre-\beta$ fraksiyonunda mevcut olmasına karşın bu bant α fraksiyonda bulunmamıştır. Bu proteinler SDS-PAGE'de göç ettikleri yer, diğer bir deyişle moleküler ağırlıkları itibariyle her ne kadar insan apo B'sinin keçideki karşılığı gibi anlaşılırsa da, keçi serumundaki apo B'nin yapı ve kompozisyonu konusunda bir çalışmaya rastlanılmamış olması nedeniyle sağlıklı bir karşılaştırma yapmanın zor olduğu bildirilmiştir (38).

Mevcut çalışmada da NaphT/MgCl₂ presipitasyon yöntemi ile $\beta + pre-\beta$ lipoproteinlerin keçi'deki apolipoprotein kompozisyonuna bakıldığında yukardaki çalışmayı doğrular nitelikte silik de olsa bir apo B-48 bandı tespit edildi. Buna karşılık insandakine göre daha az yoğun olmakla birlikte apo A-IV ve apo A-I bandı da görüldü. Fakat apo E ve C tespit edilemedi.

Normo ve hiperkolesterolemik köpeklerin HDL fraksiyonları %4 SDS- PAGE'e uygulandığı zaman, apolipoprotein B ile kontamine olmadığı gösterilmiştir. Bu da LDL'in infranatanntan tamamen presipite edildiğini doğrulamıştır. Bununla birlikte, normo ve hiperkolesterolemik köpeklerde LDL fraksiyonunun apolipoprotein A-I ile kontaminasyonunun mevcut olduğu ileri sürülmüştür. HDL ve LDL'deki mevcut apolipoprotein A-I'in dansitometrik ölçümünde, LDL fraksiyonundaki total apolipoprotein A-I'in ortalama yüzdesinin normokolesterolemik köpeklerde 3.7 ± 2.4 , hiperkolesterolemik köpeklerde 8.5 ± 1 olarak ortaya konmuştur (6).

Ultrasantrifügasyon ve presipitasyon kombinasyonunun LDL ile kontamine olmayan bir HDL fraksiyonunu elde etmede etkili olduğu tanımlanmıştır. Bu fraksiyonun saflığı, izole edilen HDL fraksiyonun agaroz ve SDS-PAGE'e uygulanmasıyla ortaya konulmuştur. Böylelikle heparin-MnCl₂ presipitasyon ayırıcının kanin plazmasının tüm LDL içeriğini presipite ettiğine işaret edilmiştir (6). LDL fraksiyonunun α göç eden lipoproteinlerle (HDL) kontaminasyonu, bu lipoprotein fraksiyonunun agaroz jel elektroforez kullanılarak gösterilmesiyle ispatlanmıştır. Muhtemelen bu lipoproteinin elektroforetik mobilitesi üstüne maniplasyonun ve depolamanın etkilerinden sonuçlanan yapay bir durum olduğu ileri sürülmüştür. İlâveten, apolipoprotein E'den zengin α lipoproteinlerin heparin-MnCl₂ ile presipite olduğu da bildirilmiştir. Bununla birlikte, total apolipoprotein AI'in sadece küçük bir miktarının LDL fraksiyonunda bulunduğu gözlenmiştir. Kanin LDL fraksiyonundaki mevcut apo AI'in plazma LDL'i ile ilişkili olmadığı için, LDL'in HDL ile kontamine olmasının bir sonucu olduğu ileri sürülmüştür (6).

Yapılan çalışmada, DS ile presipitasyonda köpek apo B-48'i çift band halinde görülürken, heparin ile presipitasyonda kedi'de çift band halinde apoB-48 görülmektedir. Köpek ve kedi'de her iki presipitasyon yönteminde de apo E ve C'nin mevcut olmadığı tespit edildi. Kanin lipoproteinlerinde apo A-I ve apo A-IV tüm presipitasyon yöntemlerinde görüldü. Kedi'de PEG metodu ile presipitasyonda apo A-I'in daha fazla olduğu tespit edildi.

At HDL'inin düşük triaçilgliserol ve yüksek protein içeriğiyle HDL2'den ziyade daha küçük dansiteli HDL3'e boyut ve hidratize dansitede açısından benzediği ileri sürülmüştür. VLDL ve LDL'in eşit yoğunlukta 2 bant halinde apo B-100 içerdiği bildirilmiştir (sırasıyla 542.5 ve 492 kDa ağırlığında). VLDL'de apo B-48 bölgesinde 3. bir band daha gözlenmiştir. Apo B-100 bandının insandaki bölgede olduğu ve apoB-

48 yakınında olan 3. bandın moleküler ağırlığının 273.5 KDa olduğu tespit edilmiştir. Bu bandın da muhtemelen şilomikron remnantlarla VLDL'in kontaminasyonunu temsil ettiği bildirilmiştir. Bu nedenle, at karaciğerinin, ratlardaki gibi, apo B'nin hem büyük (apo B-100) hem de küçük apo B-48 formlarını ürettiği ve bu açıdan multipl apo B türlerini içeren (Apo B-100, B-95, B-48 gibi) rat'lara benzediğinden bahsedilmiştir (89). At LDL'inde apo E benzeri proteinin (40 KDa moleküler ağırlıkta) varlığı bildirilmiştir (89,91). Apo C bölgesindeki (12.5 KDa) düşük moleküler ağırlıklı protein HDL'de tespit edilmiştir ve C II, C-III'e karşılık gelen 14.5 ve 12 KDa moleküler ağırlıklarındaki bantlar yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC) ile izole edilen apo C, VLDL, LDL ve HDL'de identifiye edilmiştir. Yine atlar da apo A-IV olduğu tahmin edilen, 45 KDa'luk bir protein, $d > 1.16$ g /ml'lik fraksiyonda tanımlanmıştır (91).

At LDL apolipoproteinlerinin SDS-PAGE elektroforezinin yapıldığı bir diğer çalışmada (71) yaklaşık 250.000 Da'da göç eden bir bandın (apo B), 66.000 Da'da bir albümin bandının varlığı ve 33.000 Da'da apo E'nin varlığı gösterilmiştir.

Mevcut çalışmada at'da yaklaşık 205 KDa molekül ağırlığında çift band halinde göç eden (PEG presipitasyon metodu hariç) apo B-48 tespit edildi. Apo A-I bandı tüm presipitasyon yöntemlerinde tespit edilirken, heparin/MnCl₂ metodunda yok denecek kadar az olduğu görüldü. NaphT metodunda da apo A-I az iken, PEG'de daha fazla apo A-I mevcut olduğu tespit edildi. Apo A-IV'ün de en fazla PEG olmak üzere tüm presipitasyon metotlarında mevcut olduğu gösterildi.

Fiziksel ve immunolojik çalışmalar tavuk proteinin insan apo B'sine karşılık geldiğine işaret etmiştir. Kanatlılarda VLDL ve LDL apolipoproteinlerinin yaklaşık %90'ını 21.500 moleküler ağırlıklı bir polipeptidin oluşturduğu belirlenmiştir. Fakat bazı araştırmacılar da müteakiben deterjan içeren tamponlarda jel filtrasyon kromatografisi ve SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile tavuk VLDL ve LDL'inde yüksek moleküler ağırlıklı (çözünürlüğü zayıf olan) temel apolipoproteinleri de belirlemişlerdir (19). Tavuk LDL'indeki protein içeriğinin apo B benzeri yapısının insan ve kuş lipoproteinlerinin immunolojik olarak çapraz-reaksiyonla belirlenmesinin ardından benzer bir reaksiyon tavuk ve insan VLDL'i arasında da bulunmuştur. İnsan apo B'si için bir antiserumun kullanılması, insan ve tavuk VLDL'leri ve LDL'leri arasında benzerliği ortaya koymuştur. Sonuç olarak tavuk VLDL ve LDL'inin temel apolipoproteininin insan apo B'sine analog bir protein olduğu kanıtlanmıştır. Buna rağmen, kanatlı VLDL ve LDL'inin düşük moleküler ağırlıklı apolipoproteinlerinin

insanlardan farklı olduğu ileri sürülmüştür (19). Başka bir immunolojik çalışmada insan düşük dansiteli lipoproteinlerinin 10 farklı memeli türünde LDL ile çapraz-reaksiyona girdiği, fakat tavuk lipoproteinleriyle girmedeği bildirilmiştir. Ultrasantrifugal olarak izole edilen tavuk VLDL, LDL ve HDL apolipoproteinlerinin insan serumundan hazırlanan fraksiyonlardan farklı N ve C terminal amino asitlere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu gözlemler kuş ve memeli lipoproteinlerinden elde edilen apolipoproteinlerin sadece immunolojik olarak değil ayrıca kimyasal olarak da identik olmadığına işaret etmektedir (41).

Disk jel elektroforez ile tavuk VLDL ve LDL apolipoproteinlerinin yaklaşık %90'ını 9000 Da moleküler ağırlıklı bir polipeptidin oluşturduğu ileri sürülmüştür. VLDL apolipoproteininin tek bir disülfid köprüsü ile birbirine bağlanan bir subünit içerdiği ve bu subünitenin moleküler ağırlığının yaklaşık 18.000 olduğu bildirilmiştir. Tavuk apo VLDL ve apo LDL'inde 40.000 Da moleküler ağırlıkta polipeptidlerin küçük bir oranı da disk jel elektroforezle gösterilmiştir (41).

Kanatlı HDL'inin apolipoproteinleri nisbeten iyi bilinmektedir. Bunun için kesin olarak hem tavuk hem de hindi HDL'inin temel apolipoproteininin insan apo A-I'ine homolog olduğu kanıtlanmıştır (19). Bununla birlikte, tavuk HDL'inin heterojenitesinin hala çözülmemiş olduğünden de bahsedilmektedir. Çünkü protein formlarının üre, guanidin, SDS, triton X-100 yada diğer çözücü ajanlarla tamamen çözülmediği bildirilmiştir (41) .

SDS-PAGE'de tavuk apo A-I'inin yaklaşık 28.000 Da moleküler ağırlığa sahip olduğu bulunmuştur. Bu da insandakine (28.000 Da) benzerdir (19). Memeli HDL fraksiyonlarının diğer bir apoproteini apo A-II'nin yada onun yapısal bir homologunun da tavuklarda varlığı ortaya konulmuştur (82).

Ayrıca tavuklarda apo VLDL-II diye adlandırılan düşük moleküler ağırlıklı bir proteinden bahsedilmiştir. Apo VLDL-II'nin özellikle östrojenle muamele edilmiş kuşların HDL'lerinde büyük miktarlarda bulunduğu bildirilmiştir. 14.000 ve 7000 Da moleküler ağırlıklı 2 band olarak SDS-PAGE'de görülen VLDL-II proteininin 9000 molekül ağırlıklı subünitelerden oluşan 18.000'lik bir protein olduğu ileri sürülmüştür (52).

Mevcut çalışmada, tavuk β + pre- β lipoproteinlerinin apolipoprotein kompozisyonunda apo B, PEG hariç diğer presipitasyon metotların da az da olsa tespit edildi. Tüm presipitasyon metotlarında apoA-I belirlendi. Heparin ve NaphT'da silik bir

apo A-IV mevcut iken DS ve PEG'de apo A-IV bandı tespit edilemedi. Apo E ve C belirlenemedi.

Genel olarak SDS-PAGE analizi değerlendirilecek olursa; insan ve mevcut hayvan türlerinde tüm presipitasyon metotlarında (tavuk'da DS ve PEG hariç) mevcut olan apo A-IV şilomikronların apolipoproteinidir. Kan aç karnına alındığından mevcut apo A-IV'ün muhtemelen serumda serbest halde bulunan apo A-IV'den ileri geldiği düşünülebilir. Apo A-I şilomikron ve HDL'de bulunur. Karaciğer ve bağırsaklarda sentezlenir. Mevcut çalışmada presipite edilen $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinleri analiz edildi. Agaroz jel ile de presipitadaki bu fraksiyonun mevcudiyeti doğrulandı ve sadece $\beta + \text{pre-}\beta$ fraksiyonunun presipite edildiği (α lipoproteinlerin bulunmadığı) presipitatlar alındı. Fakat bu presipitatların apolipoprotein kompozisyonlarına bakıldığında görülen apo A-I'in $d > 1.210$ fraksiyonunda bulunan serbest apolipoproteinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

$\beta + \text{pre-}\beta$ lipoprotein fraksiyonunda en fazla görmeyi beklediğimiz apo B, C ve E'dir. Apo E ve C integral apolipoproteinler değildir ve lipoproteinler arasında serbestce transfer edilebilirler. Çökme sırasında muhtemelen süpernatantda geçtiği düşünülebilir. Bunun anlaşılması için süpernatantda elektroforetik analizin yapılmasının da olaya yeterince açıklık getirmeyeceğine karar verildi. Çünkü presipite olmayan diğer serum proteinleri de süpernatantda bulunduğundan bu fraksiyonda apo E ve C'nin tespiti oldukça zordur. Ancak apo B-48 ve apo B-100 integral apolipoproteinlerdir, yani lipoprotein partikülleri içinde gömülüdürler ve diğer lipoprotein fraksiyonlarına transfer edilemezler (13, 60). Her ne kadar PEG ve kısmen de DS ile presipitasyon metodunda apo B-48'ler görülmekte ise de apo B-100 sadece insanda NaphT metodunda görülmektedir. Apo B-100 her lipoprotein fraksiyonunda 1 molekül olarak bulunmaktadır. Bu nedenle bu proteinin jel üzerinde tespiti için daha yoğun lipoprotein presipitatlarının hazırlanması gerekir. Bir diğer ihtimal de apo B'lerin presipitasyon sırasında lipoprotein partikülünde meydana gelen konformasyonel değişiklikler neticesinde lipoprotein partikülünden ayrılıp süpernatanta geçme ihtimalidir. Diğer hayvan türlerinde serum apolipoprotein konsantrasyonları bilinmediğinden bir karşılaştırma yapmak da zordur. Sonuç olarak, SDS-PAGE analiziyle ortaya konan apolipoprotein kompozisyonu presipite olan $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinleri tanımlamada yeterli olmadığı anlaşılmaktadır. Ancak agaroz jel bu lipoproteinlerin presipitasyonunu doğrulamaktadır.

Değişik presipitasyon metotlarıyla ve ultrasantrifügasyon metoduyla elde edilen HDL kolesterol değerinin, eğer turbid süpernatantlar ultrafiltre edilirse hem normal hem de lipemik serumlar için uyumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Buna rağmen enzimatik kolesterol analizi kullanıldığında, fosfotungstat metodunun yada PEG metodunun tercih edilmesini önermişlerdir (25).

Test edilen modifiye presipitasyon metodlarının tümünün HDL kolesterol için benzer sonuçlar verdiği ileri sürülen bir başka çalışmada (88) : Heparin-Mn⁺² (92mmol/L) ve pH10 /Mg⁺² metotlarıyla elde edilen sonuçların DS/Mg⁺² prosedürüyle uyumlu olduğu, heparin-Mn⁺² (46mmol/L) ve 2 farklı PEG metodunun biraz daha yüksek HDL kolesterol sonuçları verdiği bildirilmiştir. Presipitasyon etkinliğine göre metodlar: PEG (pH10) > DS-Mn⁺² > Heparin-Mn⁺² (92mmol/L) = PEG 75g/L > pH10/Mg > Heparin-Mn⁺² (46mmol/L) (88) şeklinde sıralanmıştır.

Sonuç olarak, hem agaroz jel elektroforezis hem de SDS-PAGE bir arada değerlendirildiğinde; NaphT/MgCl₂ ve DS/MnCl₂ presipitasyon prosedürleri ile β + pre-β ve α lipoproteinlerinin separasyonlarının diğer presipitasyon prosedürlerine göre daha iyi yapıldığı tespit edildi. PEG metodunun da iyi bir presipitasyon sağlmasına rağmen, artan ayıraç konsantrasyonlarına rağmen presipitattaki α bandı tespit edilemedi. Heparin/MnCl₂ metodunun sadece sığır serum lipoproteinlerinin separasyonunda daha etkin olduğu tespit edildi. Presipitasyon prosedürlerinin etkinliği süpernatant HDL kolesterol ölçümünün hassasiyetinden ziyade elektroforetik separasyonlarına göre değerlendirildi. Oysa HDL kolesterol ölçümü için tablo 19'daki ayıraç konsantrasyonları kullanılarak β + pre-β lipoproteinler mevcut presipitasyon metotlarıyla presipite edilebilir. Fakat presipite olan serum β + pre-β lipoproteinlerinin lipid kompozisyonlarının ve elektroforetik özelliklerinin belirlenmesinde, elektroforetik olarak separasyonunda ve miktar tayininde kullanılmasında yada izole edilmesinde NaphT/MgCl₂ ve DS/MnCl₂ metotları diğerlerine göre daha elverişlidir. PEG ve Heparin/MnCl₂ presipitasyon metotlarında da ilave edilen ayıraçlar serum β + pre-β lipoproteinlerini presipite etmekte fakat presipitattaki lipoprotein/polianyon divalent katyonun yeterli dissosiasyonu sağlanamadığından elektroforetik olarak iyi bir separasyon sağlanamadı.

Mecut araştırma ileriye dönük birçok çalışma gerektirmektedir. Başta PEG ve Heparin/MnCl₂ metodu olmak üzere diğer presipitasyon prosedürlerinde daha etkili presipitasyon ve elektroforetik separasyonun sağlanması amacıyla modifikasyonlar

yapılmalıdır. Daha detaylı olarak hayvan lipoproteinlerinin apolipoprotein kompozisyonları değerlendirilerek her hayvan türü için belirli bir standart oluşturulabilir. Böylelikle hem presipitasyonla separasyonun etkinliği daha doğru değerlendirilebilir hem de dislipoproteinemiaların belirlenmesinde yararlanılabilir. İnsanlarda kullanılan ayıraç konsantrasyonlarının her hayvan türü için elverişli olmadığı ve hatalı sonuçlar verdiği bilinmektedir. Bu nedenle hayvan türlerine göre nisbeten değişen ve tablo 19'da belirtilen ayıraç konsantrasyonları ile yapılan β + pre- β lipoproteinlerin presipitasyonu sonucu hayvan lipoproteinleriyle ilgili analizlerin yapılmasında daha doğru sonuçlar elde edilecektir. Ayrıca daha hassas boyama metotlarının uygulanması ile lipoprotein bantlarının konsantrasyon tespitleri bir scanner vasıtasıyla yapılabilir.



6. 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. β ve pre- β lipoproteinlerin separasyonu için en yaygın olarak kullanılan tekniklerden bir tanesi presipitasyon tekniğidir. Bununla beraber laboratuvarında kullanılan lipoprotein separasyon tekniklerinden hiçbiri hayvan lipoproteinlerinde kullanım için geliştirilmemiştir. Bu lipoprotein separasyon prosedürlerinin mevcut hayvan türlerinin plazmasına uygulanmadan önce muhtemelen modifiye edilmesi gerektiği ileri sürülmüştür. Bunun için, mevcut çalışma, insan ve çeşitli hayvan serumlarındaki β + pre- β lipoproteinleri presipite etmek için gerekli presipitasyon ayıraçlarının (heparin/ $MnCl_2$, dekstran sülfat/ $MnCl_2$, sodyum fosfotungstat/ $MgCl_2$, polietilen glikol) konsantrasyonlarını karşılaştırmak üzere gerçekleştirildi.

Bu amaçla, ilk olarak insan serum lipoproteinleri ve daha sonra çeşitli hayvan türlerinin serum lipoproteinleri (β + pre- β) farklı presipitasyon metotları kullanılarak presipite edildi. Presipite edilen lipoproteinler agaroz jel elektroforez ile separe edildi. İnsan serumu için sıkça kullanılan orijinal heparin/ $MnCl_2$ presipitasyon metodu ile uyumlu olarak 200 IU heparin/ $MnCl_2$ çalışmada mevcut hayvan türlerinin serum β + pre- β lipoproteinlerini tam olarak presipite etti. Oysa, sığır serumu aynı lipoprotein sınıflarının presipitasyonu için insan serumunda kullanılan yaklaşıp 2 kat fazla heparin/ $MnCl_2$ gerektirdi. İnsan serumu için kullanılan konsantrasyonda dekstran sülfat/ $MnCl_2$ 'ün ilavesi tüm hayvan türlerinin serum β + pre- β lipoproteinlerini tam olarak presipite etti. Sodyum fosfotungstat/ $MgCl_2$ presipitasyon metodu ile, keçi ve koyun serum β + pre- β lipoproteinleri insan serumu için gerekli olandan 2 kat daha fazla sodyum fosfotungstat/ $MgCl_2$ ile presipite edildi. Diğer hayvan türlerinin serum β + pre- β lipoproteinleri insan lipoproteinlerinin separasyonu için kullanılanla aynı konsantrasyondaki sodyum fosfotungstat/ $MgCl_2$ ile presipite edildi. İnsan serumunda olduğu gibi, %13'lük polietilen glikol'ün ilavesi tavuk hariç diğer tüm hayvanlarda β + pre- β lipoproteinlerin tam olarak presipitasyonunu sağladı. İnsandaki konsantrasyonla karşılaştırıldığında tavuk serum β + pre- β lipoproteinlerinin presipitasyonu için polietilen glikolün yarı konsantrasyonu kullanıldı. Sodyum fosfotungstat/ $MgCl_2$ ve dekstran sülfat/ $MnCl_2$ metotları ile presipite edilen serum β + pre- β lipoproteinlerinin

tam olarak dissosiasyonu sağlandı ve bunu takiben agaroz jel elektroforez ile separe edildi. Bununla birlikte, heparin/MnCl₂ metodu ile presipite edilen lipoproteinlerin tam bir dissosiasyonu ve elektroforetik separsyonu elde edilemedi. Tamamen presipite edilen lipoproteinlerin (β + pre- β) apolipoprotein kompozisyonları SDS-PAGE ile analiz edildi.

Serum β + pre- β lipoproteinlerin presipitasyonu için kullanılan polianyon/divalent katyonların ve nötral polimerlerin konsantrasyonlarının insan ve çeşitli hayvan türleri arasında farklılık gösterdiği sonucuna varıldı. Mevcut farklılıklar, lipoproteinlerin türler arasındaki lipit kompozisyonlarındaki değişiklikler kadar lipoproteinlerin yüzey yüklerindeki varyasyonlara da atfedilebilir.



7. 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 necessitates the quantification of the individual lipoprotein classes. One of the most commonly used techniques for the separation of β and pre- β 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 precipitation reagents (heparin/ MnCl_2 , dextran sulfate/ MnCl_2 , sodium fosfotungstat/ MgCl_2 , polyethylene glycol) necessary in order to precipitate β + pre- β lipoproteins in human and various animal sera.

To this end, firstly human serum lipoproteins and later the serum lipoproteins (β + pre- β) of the various animal species were precipitated using various precipitation methods. The lipoproteins precipitated were separated by agarose gel electrophoresis. In accordance with the original heparin/ MnCl_2 precipitation method being commonly used for human serum, 200 IU heparin / $46\mu\text{mol MnCl}_2$ yielded complete precipitation of β + pre- β lipoproteins in sera from all the animal species investigated. Whereas bovine serum required approx. 2 times more heparin/ MnCl_2 for the precipitation of same lipoprotein classes than did human serum whereas chicken serum required half of the reagent concentration. Addition of dextran sulfate/ MnCl_2 at the concentration used for human serum resulted in complete precipitation of β + pre- β lipoprotein of sera from all animal species. In sodium fosfotungstat/ MgCl_2 precipitation method, β + pre- β lipoproteins of goat and sheep were precipitated by two times more sodium fosfotungstat/ MgCl_2 than that required for human serum β + pre- β lipoproteins. In other animal species β + pre- β lipoproteins were precipitated by the same sodium fosfotungstat/ MgCl_2 concentration as human lipoproteins. As with the human serum, employment of 13% polyethylene glycol resulted in full precipitation of β + pre- β lipoproteins of all the animal species except chicken. With the chicken serum half the concentration of polyethylene glycol was used as compared to human serum.

The serum $\beta + \text{pre-}\beta$ and α lipoproteins precipitated by sodium fosfotungstat/ MgCl_2 and dextran sulfate/ MnCl_2 methods were completely dissociated and consequently separated by agarose gel electrophoresis. However, with the heparin/ MnCl_2 method complete dissociation and electrophoretical separation of the lipoproteins precipitated was not achieved. Apolipoprotein compositions of the lipoproteins ($\beta + \text{pre-}\beta$) fully precipitated were analyzed by SDS-PAGE.

It was concluded that the concentrations of polyanion/divalent cation and neutral polymers used for the precipitations of serum $\beta + \text{pre-}\beta$ 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 between species.



8. KAYNAKLAR

- 1- Annison, F. (1983). Lipid Metabolism., Physiology Biochemistry Domestic Fowl., 4, 165-173.
- 2- Arnold, K. and Zschörning, O. (1998). Aggregation of Human Plasma Low Density Lipoproteins by Means of Poly(ethylene glycol). Biomed. Biochim. Acta, 47, (12), 949-954.
- 3- Arnold, K., Arnold, J., Zschörning, O., Wiegel, D. and Krumbiegel, M. (1989). Characterization of Chemical Modification of Surface Properties of Low Density Lipoproteins. Biomed. Biochim. Acta, 48, (10), 735-742.
- 4- Assmann, G., Schriewer, H., Schmitz, G., and Hagele, E.O. (1983). Quantification of High Density Lipoprotein Cholesterol by Precipitation with Phosphotungstic Acid/MgCl₂. Clin. Chem., 29, 2026-2030.
- 5- Bahler, R.C., Oppl, J.J., Waggener, D.M. (1980). Lipoproteins in Patients with Proved Coronary Artery Disease : Quantitative Changes in Agarose Gel Electrophoretic Patterns. Circulation, 62, (6), 1212-1220.
- 6- Barrie, J., Nash, A.S. and Watson, T.D.G. (1993). Quantitative Analysis of Canine Plasma Lipoproteins. Journal of Small Animal Practice, 34, 226-234.
- 7- Barrie, J., Watson, T.D.G., Stear, M.J. and Nash, A.S. (1993). Plasma Cholesterol and Lipoprotein Concentrations in Dog : The Effects of Age, Breed, Gender, and Endocrine Disease. Journal of Small Animal Practice., 34, 507-512.
- 8- Bauer, J.E. (1983). Plasma Lipids and Lipoproteins of Fasted Ponies. Am. J. Vet. Res., 44, (3), 379-384.
- 9- Bauer, J.E., Meyer, D.J., Goring, R.L., Beauchamp, C.H., Jones, J. (1989). Lipoprotein Cholesterol Distribution in Experimentally Induced Canine Cholestasis. P. 343-351, Eds. Rivers, J.P.W., Burger, I.H. In: "Nutritional Dog and Cat." Cambridge University Press, Cambridge.
- 10- Bauer, J.E., Meyer, D.J., Campbell, M., McMurphy, R. (1990). Serum Lipid and Lipoprotein Changes in Ponies with Experimentally Induced Liver Disease. Am. J. Vet. Res., 51, (9), 1380-1384.
- 11- Bauer, J.E. (1992). Diet-Induced Alterations of Lipoprotein Metabolism. JAVMA, 201, (11), 1691-1694.
- 12- Bauer, J.E. (1996). Evaluation and Management of Hyperlipidemia in Horses. Vet. Clin. Nutr., 3, (4), 137-139.
- 13- Brewer, H.B., Gregg, R.E., Hoeg, J.M. and Fojo, S.S. (1988). Apolipoproteins and Lipoproteins in Human Plasma: an Overview. Clin. Chem., 34, (8B), B4-B8.

- 14-Buening, G.M. (1973). Hypolipidemia and Hypergammaglobulinemia Associated with Experimentally Induced Anaplasmosis in Calves. *Am.J.Vet.Res.*, 35, (3), 371-374.
- 15-Burstein, M., Scholnick, H.R., Morfin, R., Rogers, W.A., Donovan, E.F., Kociba, G.J. (1970). Rapid Method for the Isolation of Lipoproteins from Human Serum by Precipitation with Polyanions. *J. Lipid Res.*, 11, 583-595.
- 16-Burstein, M. (1973). Lipoprotein – Polyanion - Metal Interactions. *Adv. Lipid Res.*, 11, (67), 67-107.
- 17- Camejo-E.V., Camejo, G. and Sartipy, P. (1989). Measurements of Proteoglycan-Lipoprotein Interaction by Gel Mobility Shift Assay. P.267-279, Ed. Ordavas, J.M., In: "Lipoprotein Protocols" Humana Press, Totowa, New Jersey.
- 18-Carcelain, G., David, F., Lepage, S., Bonnefant-Rousselot, D., Delattre, J., Leerand, A., Peynet, J., and Troupel, S. (1992). Simple Method for Quantifying α -Tocopherol in Low-Density + Very Low Density Lipoproteins and In High-Density Lipoproteins. *Clin.Chem.*, 38, (9), 1792-1795.
- 19-Chapman, M.J. (1980). Animal Lipoproteins : Chemistry, Structure, and Comparative Aspects. *J.Lipid Res.*, 21, 789-853.
- 20-Chiba, H., Akita, H., Tsuchihashi, K., Hui, S-P., Takahashi, Y., Fuda, H., Suzuki, H., Shibuya, H., Tsuji, M., and Kobayashi, K. (1997). Quantitative and Compositional Changes in High Density Lipoprotein Subclasses in Patient with Various Genotypes of Cholesteryl Ester Transfer Protein Deficiency. *J. Lipid Res.*, 38, 1204-1216.
- 21-Contois, J.H., Gilmor, R.G., Moore, R.E., Contois, L-R., W., Macer, J.L., Wu, A.H.B. (1999). Quantitative Determination of Cholesterol in Lipoprotein Fractions by Electrophoresis. *Clin. Chim. Acta*, 282, 1-14.
- 22-Cooper, A.D. (1997) Hepatic Uptake of Chylomicron Remnants. *J.Lipid Res.*, 38, 2173-2192.
- 23-Cornwell, D.G., and Kruger, F.A. (1961). Molecular Complexes in the Isolation and Characterization of Plasma Lipoproteins, *J. Lipid Res.*, 2, (2), 110-134.
- 24-Demacker, P.N.M., Hijmans, A.G.M., Vos-Janssen, H.E., Van't Laar, A., Jansen, A.P. (1980). A study of The Use of Polyethylene Glycol in Estimating Cholesterol in High Density Lipoprotein. *Clin.Chem.*, 26,(13), 1775-1779.
- 25-Demacker, P.N.M., Vos-Janssen, H.E., Hijmans, A.G.M., van't Laar, A. and Jansen, A.P. (1980). Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol in Serum: Comparison of Six Isolation Methods Combined with Combined with Enzymic Cholesterol Analysis. *Clin. Chem.*, 26, (13), 1780-1786.

- 26-Demacker, P.N.M. (1985). Accuracy and Precipitation Efficiency of Improved Precipitation-Methods for Quantifying High-Density-Lipoprotein Cholesterol. *Clin.Chem.*, 31, (10), 1768-1770.
- 27-Demacker, P.N.M., Hessels, M., Toenhake - Dijkstra, H. and Baadenhuijsen, H. (1997). Precipitation Methods for High-Density Lipoprotein Cholesterol Measurement Compared, and Final Evaluation under Routine Operating Conditions of a Method with a Low Sample-to-Reagent Ratio. *Clin.Chem.*, 43,(4), 663-668.
- 28-Downs, L.G., Bolton, C.H., Cripsin, S.M., Wills, J.M. (1993). Plasma Lipoprotein Lipids in Five Different Breeds of Dogs. *Res. Vet. Sci.*,54, 63-67.
- 29-Dryden, F.D., Marchello, J.A., Adams, G.H. and Hale, W.H. (1971). Bovine Serum Lipids, II.Lipoprotein Quantitative and Qualitative Composition as Influenced by Added Animal Fat Diets. *J.Anim.Sci.*, 32, 1016-1029.
- 30-Eisenberg, S. (1984). High Density Lipoprotein Metabolizm. *J. Lipid Res.*, 25, 1017-1059.
- 31-Eklund, A., Sjöblom, L. (1986). Improved Banding Pattern of Rat Plasma Lipoproteins Developed by Agarose Gel Electrophoresis at pH7.0. *Biochimica et Biophysica Acta*, 877, 135-140.
- 32-Ferreri, L.F., Gleockler, D.H. (1979). Electrophoretic Charecterization of Bovine Lipoprotein Subfractions Isolated by Agarose Gel Chromatography. *J. Dairy Sci.*, 62, 1577-1582.
- 33-Friedewald, W.T., Levy, R.J. and Fredrickson, D.S. (1972). Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in plasma without use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin.Chem.*,18, 499-509.
- 34-Gerloff, B.J. Herd, T.H.(1984). Hepatic Lipidosis from Dietary Restriction in Nonlactating Cows. *JAVMA*, 185, (2), 223-224.
- 35-Griel, L.C. and McCarthy, R.D. (1969). Blood Serum Lipoproteins : A Review. *J.Dairy Sci.*, 52, (8), 1233-1243.
- 36-Güldür, T., Ozan, S., Doğrul, M. (1995). Koyun ve Sığır Karaciğerinde Yerleşen Bazı Paraziter Hastalıklarda Lipoprotein Profili. *F.Ü. Sağlık Bil. Derg.*, 9, (2), 147-155.
- 37-Güldür, T., İleri, T. (1996). İnsan ve Keçi Serumundaki Lipoproteinlerin Fosfotungstik Asit/MgCl₂ Presipitasyon Metodu ile Seperasyonunun Karşılaştırılması. *F.Ü.Sağlık Bil. Derg.*, 10,(2), 175-182.
- 38-Güldür, T., Ozan, S. and İleri, T. (1999). Lipoproteinlerin Total Apolipoproteinlerinin Karbohidrat Kompozisyonlarının Karşılaştırılması. *J. Vet. Anim. Sci.*, 23, (4), 777-784.

- 39-Hames, B.D. and Rickwood, D. (1981). *Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford. Washington DC.
- 40-Harry D.S., Owen, J.S., McIntyre, N. (1983). Lipids, Lipoproteins and Cell Membranes. P.319-329. Eds. Poppes, H. And Shaffer, F.In: " *Progress in Liver Disease*, Grune & Strattor.
- 41-Hillyard, L.A., White, H.M., and Pangburn, S.A. (1972). Characterisation of Apolipoproteins in Chicken Serum and Egg Yolk. *Biochemistry*, 11, (4), 511-518.
- 42-Hoffman, G.E., Hiefinger, R., Weiss, L., and Poippe, W. (1985). Five Methods for Measuring Low Density Lipoprotein Cholesterol Concentration in Serum Compared. *Clin. Chem.*, 31, (10), 1729-1730.
- 43-Iverius, P.H., Laurent, T.C. (1967). Precipitation of Some Plasma Protein by the Addition of Dextran or Polyethylene Glycol. *Biochem.Biophys.Acta*, 133, 371-373.
- 44-Izzo, C., Grillo, F., and Murador, E. (1981). Improved Method for Determination of High Density Lipoprotein Cholesterol I.Isolation of High Density Lipoproteins by Use of Polyethylene Glycol 6000. *Clin. Chem.*, 23, (3), 371-374.
- 45-Jackson, R.L., Busch, S.J., and Cardin, A.D. (1991). Glycosaminoglycans: Molecular Properties, Protein Interactions, and Role in Physiological Processes. *Biological Reviews*, 2, 481-539.
- 46-Jones, B.R., Hancock, W.S., Campbell, C.H. (1983). Occurrence of Idiopathic, Familial Hyperchylomicronemia in a Cat. *Veterinary Record*, 112, 543-547.
- 47-Kaneko, J.J. (1989). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*.4nd ed.Academic Press, Inc. San Diego, California.
- 48-Kaplan, I.V. and Levinson, S.S. (1998) Apolipoprotein and Related Testing as Markers for Coronary Artery Disease.*Lab.Med. Inter.*, July, 13-14.
- 49-Kjellén, L. and Lindahl, U. (1991) Proteoglycans : Structures and Interactions. *Annu. Rev.Biochem.*, 60, 443-475.
- 50-Kostner, G.M., Molinari, E., and Pichler, P. (1985) Evaluation of a New HDL2/HDL3 Quantitation Method Based on Precipitation with Polyethylene Glycol. *Clin. Chim. Acta*, 148, 139-147.
- 51-Kris-Etherton, P.M., and Etherton, T.D. (1982). The Role of Lipoproteins in Lipid Metabolism of Meat Animals. *J.Anim.Sci.*, 55, (4), 804-817.
- 52-Kudzma, D.J., Swaney, J.B. and Ellis, E.N. (1979). Effects of Estrogen Administration on the Lipoproteins and Apoproteins of the Chicken. *Biochim.Biophys.Acta*, 572,257-268.

- 53-Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assemble of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227 (15), 680-685.
- 54-Leat, W.M.F. and Northrop, C.A. (1975). Plasma Lipids and Lipoproteins of Some Herbivorous Mammals. *Proc.Nutr.Soc.*,34, 105A-107A.
- 55-Lee, C.C., Kao, S.I. (1988) Separation of Three Compositionally Distinct Subclasses of Rat High Density Lipoproteins by Heparin-Affinity Chromatography. *Atherosclerosis*, 70 (3), 205-215.
- 56-Lindahl, U., and Höök, M. (1978). Glycosaminoglycans and Their Binding to Biological Macromolecules. *Ann.Rev.Biochem.*, 47, 385-417.
- 57-Lopes-Virella, M.F., Stone, P., Ellis, S., Colwell, J.A. (1977). Cholesterol Determination in High Density Lipoproteins Separated by Three Different Methods. *Clin. Chem.*, 23, (5), 882-884.
- 58-Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J.Biol.Chem.*, 193, 265-275.
- 59-Lundberg, B., Högström, S., Pietilainen, P., Suaminen, M., Viikari, J. (1984). Separation of Plasma High-Density Lipoprotein Subclasses by A Combined Precipitation Method Using Polyethylene Glycol 6000 and Dextran Sulfate. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 44, 305-309.
- 60-Mayes, P.A. (1990). Lipid Transport and Storage.P.226-234.Eds. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. In:Harper's Biochemistry.Twenty-Second Ed., Appleton & Lange, California.
- 61-Mazur, A., Marcos, E. and Rayssiguier, Y. (1989). Plasma lipoproteins in Dairy Cows with Naturally Occuring Severe Fatty Liver : Evidence of Alteration in the Distrubition of Apo A-I-Containing Lipoproteins. *Lipids*, 24, 805-811.
- 62-Milne, E.M., Doxey, Gilmour, J.S. (1990). Serum Lipids and Lipoproteins in Equine Colic and Grass Sickness. *Res.Vet. Sci.*, 48, 170-174.
- 63-Naito, H.K. (1989). High-Density Lipoprotein (HDL) Cholesterol. P.983-991. Eds. Kaplan,L.A., Pesce, A.J. In: "Clinical Chemistry Theory, Analysis and Correlation", 2nd ed., the C.V., Mosby Company, St Louis, Washington D.C., Toronto.
- 64-Naito, H.K. (1989). Lipoprotein Electrophoresis. P.1195-1207, Eds. Kaplan, L.A., Pesce, A.J. In : "Clinical Chemistry Theory, Analysis and Correlation",2nd ed., the C.V. Mosby Company, St Louis, Washington D.C., Toronto.
- 65-Nauck, M., März, W., Haas, B., and Wieland, H. (1996). Homogeneous Assay for Direct Determination of High-Density Lipoprotein Cholesterol Evaluated. *Clin.Chem.*42, (3), 424-429.

- 66-Nieto, C. G., Barrera, R., Habela, M. A., Navarreto, I., Molina, C., Jiménez, A. and Serrara, J. L. (1992). Changes in Plasma Concentrations of Lipids and Lipoprotein Fractions in Dogs Infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 44, 175-182.
- 67-Noble, R.P. (1968). Electrophoretic Separation of Plasma Lipoproteins in Agarose Gel. *J. Lipid Res.*, 9, 693-700.
- 68-Rainwater, D.L. and Kushwaha, R.S (1988). Characterization of Very-Low-Density Lipoprotein Isolated from Baboons and Fractionated Using Heparin-Sepharose Chromatography. *Biochim.Biophys.Acta*, 958,(3), 416-423.
- 69-Robbie, S.M., Janson, C.H., Smith, S.C., O'Connor, J.T. (1975). Equine Serum Lipids: Lipid Composition and Electrophoretic Mobility of Equine Serum Lipoprotein Fractions. *Am.J.Vet.Res.*, 36, (12), 1715-1717.
- 70-Robie,S.M., Smith,S.C., O'Connor, J.T. (1975). Equine Serum Lipids: Serum Lipoprotein Profiles of Morgan and Thoroughbred Horses. *Am. J. Vet. Res.*, 36, (12), 1709-1713.
- 71-Rogers, W.A., Donovan, E.F., Kociba, G.J. (1975). Idiopathic Hyperlipoproteinemia in Dogs. *JAVMA*, 166, 11, 1087-1091.
- 72-Rogers, W.A., Donovan, E.F., Kociba, G.J. (1975). Lipids and Lipoproteins in Normal Dogs and in Dogs with Secondary Hyperlipoproteinemia. *JAVMA*, 166, (11), 1092-1100.
- 73-Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 74-Scanu, A.M. (1986). Plasma Lipoproteins : An Overvie.P.1-9, Eds.Scanu, A.M and Spector, A.A.In: "Biochemistry and Biology of Plasma Lipoproteins", Morcel Dekker, Inc.USA.
- 75-Seidel, D., Gretz, H., Ruppert, C. (1983). Significance of the Lp-X Test in Differential Diagnosis of Jaundice. *Clin.Chem.*,19, (1), 86-90.
- 76-Shepherd, J. (1991). Equine Plasma Lipoproteins: Comperative Lessons. *Equine Vet. J.*, 23, (5), 329-330.
- 77-Siekmeier, R., März, W., and Gross,W. (1990). Insufficinet Accuracy and Specificity of Polyanion Precipitation Methods for Quantifying Low - Density Lipoproteins, *Clin. Chem.*, 36, (12), 2109-2113.
- 78-Skjold, A.C., Freitag, J.F., Stover, L.R., Berry, H.K. (1980). Determination of High-Density Lipoprotein Cholesterol by Heparin-MnCl₂ Precipitation. *Clin.Chem.*, 26, (9), 1369.

- 79-Stead, D., and Welch, V.A. (1975). Lipid Composition of Bovine Serum Lipoproteins. *J.Dairy.Sci.* 58, (4), 122-127.
- 80-Steele, B. W., Koehler, D.F., Azar, M. M., Blaszkowski, T. P., Kuba, K. and Dempsey, M.E. (1976). Enzymatic Determination of Cholesterol in High-Density Lipoprotein Fractions Prepared by a Precipitation Technique. *Clin. Chem.*, 22, (1), 98-101.
- 81-Van Dijk, S. and Wensing, T.H. (1989). 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.*, 94B, (4), 735-738.
- 82-Vieire, P. M., Vieira, A.V., Sanders, E. J., Steyrer, E., Nimpf, J. and Schneider, W. J. (1995). Chicken Yolk Contains Bona Fide High Density Lipoprotein Particles.*J. Lipid Res.*, 36, 601-610.
- 83-Viikari, J. (1976). Precipitation of Plasma Lipoproteins by PEG-6000 and Its Evaluation with Electrophoresis and Ultracentrifugation. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 36, 265-268.
- 84-Vitic.J., Stevanoic, J. (1993). Comperative Studies of The Serum Lipoproteins and Lipid in Some Domestic, Laboratory and Wild Animals. *Comp.Biochem. Physiol.*, 106B, (1), 223-229.
- 85-Warnick.G.R., and Albers, J.J. (1978). A Comprehensive Evaluation of Heparin-Manganese Procedure for Estimating High Density Lipoprotein Cholesterol. *J. Lipid Res.*, 19, 65-76.
- 86-Warnick, G.R., Benderson, J.M., and Albers, J.J. (1982). Quantitation of High-Density Lipoprotein Subclasses after Separation by Dextran Sulphate and Mg^{+2} Precipitation. *Clin. Chem.*, 28, (7), 1574.
- 87- Warnick, G.R., Benderson, J.M. and Albers, J.J.(1982). Dextran Sulfate- Mg^{+2} Precipitation Procedure for Quantitation of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *Clin.Chem.*, 28, (6), 1379-1388.
- 88-Warnick, G.R., Nguyen, T., and Albers, A.A. (1985). Comparasion of Improved Precipitation Methods for Quantification of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *Clin. Chem.*, 31, (2), 217-222.
- 89-Watson, T.D.G., Burns, L., Love, S., Packard, C.J., and Shepherd, J. (1991). The Isolation, Characterisation and Quantification of the Equine Plasma Lipoproteins. *Equine Vet. J.*, 23, (5), 353-359.
- 90-Watson, T.D.G., Burns,L., Love,S., Packard, C.J. and Shepherd, J. (1992).Plasma Lipids, Lipoproteins and Post-Heparin Lipases in Ponies with Hyperlipaemia. *Equine Vet.J.*, 24,(5), 341-346.

- 91-Watson, T.D.G., Burns, L., Freeman, D.J., Packard, C.J., and Shepherd, J. (1993). High Density Lipoprotein Metabolism in the Horse (*Equus caballus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 104B, (1), 45-53.
- 92-Wendlandt, R.M. and Davis, C.L. (1972). Characterization of Bovine Serum Lipoproteins. *J. Dairy Sci.*, 56, (3), 337-339.
- 93-Wiebe, D.A., Smith, S. J. (1985). Six Methods for Isolating High-Density Lipoprotein Compared, with Use of the Reference Method for Quantifying Cholesterol in Serum. *Clin. Chem.*, 31, (5), 746-750.
- 94-Wieland, H., and Seidel, D. (1983). A Simple Specific Method for Precipitation of Low Density Lipoproteins. *J. Lipid Res.*, 24, 904-909.
- 95-Wilson, D.E., Spiger, M.J. (1973). A Dual Precipitation Method for Quantitative Plasma Lipoprotein Measurement Without Ultracentrifugation Method. *J. Lab.Clin.Med.*, (3), 473-482.
- 96-Yagi, Y., Kamio, T., Fujisaki, K., Shimizu, S., Nagasawa, S. and Terada, Y. (1992). Plasma High Density Lipoprotein in Anemic Cattle Infected with *Theileria Sargentii*, *J. Vet. Sci.* 54, (1), 13-18.
- 97-Zeppezauer. M., Brishammar, S. (1965). Protein Precipitation by Uncharged Water-Soluble Polymers, *Biochem.Biophys.Acta*, 94. 581-583.

9.ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Elazığ'ın Keban ilçesinde doğmuşum. İlköğretim ve lise tahsilimi Elazığ'da tamamladım.1988 yılında Elazığ F.Ü. Veteriner Fakültesini kazandım.1993 yılında Veteriner Fakültesinden 2.'likle mezun oldum. 1994 yılında F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açmış olduğu doktora programı kapsamında Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora başladım. Doç.Dr. Tayfun GÜLDÜR danışmanlığında doktora programını tamamladım.



10.TEŞEKKÜR

Öncelikle en umutsuz anımda bana cesaret veren, maddi, manevi ve bilimsel hiçbir desteğini esirgemeyen yeri gelip laboratuvarında benimle çalışan danışman hocam Doç.Dr. Tayfun GÜLDÜR'e sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim. Daima zorluklarla mücadele etmeyi, asla imkansız bir şey olmadığını öğreten, gerçek anlamda bir bilim adamı olma yolunda beni teşvik eden değerli danışman hocama ne kadar layık bir öğrenci oldum bilemiyorum. Ama hocamın şunu bilmesini istiyorum : Bana vermek istediği herşeyi yeterince yapamasam da gördüm ve çok şanslı olduğumu biliyorum. Farkında olmadan yaptığım hatalardan dolayı da kendilerinin affına sığınırım.

Danışman hocamın dışında, başta bir dönem danışmanlığımı üstlenen manevi desteğini ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN'a olmak üzere kürsümüzün diğer değerli hocaları Doç. Dr. Necmi ÖZDEMİR , Yrd.Doç.Dr. Mine DOĞRUL ve Yrd.Doç.Dr. Seval YILMAZ'a huzurlu bir çalışma ortamını ve gerekli laboratuvar imkanlarını sağladıkları için ayrı ayrı teşekkür ederim. Asistan arkadaşlarım Sema YARALIOĞLU, Mehtap ÖZÇELİK, Fulya BENZER, Özgür KAYNAR, Bülent TAŞDEMİR'e de gösterdikleri fedakarlıklardan ve yardımlarından ötürü teşekkür ederim. Kürsümüzün sekreteri Yaşar PEKİNCE'ye ne zaman başım sıkışsa elinden gelen yardımı esirgemediği için ayrıca teşekkür ederim. Aynı şekilde kürsümüz çalışanlarından Fatih KARA'ya da yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca gösterdikleri yardım ve kolaylıklardan dolayı ELET ve KÖYTÜR çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca F.Ü Hayvan Hastanesi'ndeki tüm hocalarımıza ve asistanlara, Tıp Biyokimya hocalarına ve çalışanlarına gösterdikleri yardımlardan ötürü teşekkür ederim. Fotoğraf çekimlerindeki fedakarlıklardan ötürü tüm Foto Hayat çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak perde arkasında görünen ama manevi desteklerini ve ellerinden gelen tüm yardımları esirgemeyen aileme teşekkür etmek istiyorum. Başta annem olmak üzere, her aşamadaki yoğun destek ve yardımlarından dolayı kız kardeşime, erkek kardeşime, uzak da olsa manevi desteğini hiç eksik etmeyen nişanlıma teşekkürlerimi bir borç bilirim. Şu anda aramızda olmayan rahmetlik babamın da bu günleri görmesini çok isterdim. Ama ona da malum olduğuna inanıyorum. Bu günlere gelmemde emeği geçen babama da çok teşekkür ederim.Ruhu şad olsun.

Burada isimleri zikredilmeyen daha bir çok insanın yardımının geçtiğine inanıyorum. Emeği geçen herkese tekrar sonsuz teşekkürlerimi sunarım.