

İnsan ve Bazı Evcil Hayvan Türlerinin Serum $\beta + \text{Pre-}\beta$ Lipoproteinlerinin Dekstran Sülfat/ MnCl_2 ve Sodyum Fosfotungstat/ MgCl_2 Presipitasyon Metotları ile Karşılaştırmalı İzolasyonları*

Tülay İLERİ, Tayfun GÜLDÜR

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 23119, Elazığ - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 31.01.2001

Özet: Lipoproteinler, çeşitli dokular arasında depolanma ve kullanım için çeşitli lipidleri nakleden suda-çözünür komplekslerdir. Lipoproteinlerin koroner arter hastalığı riski ve çeşitli tip dislipoproteinemiler ile olan bağlantısı lipoprotein fraksiyonlarının miktar tayinini gerekli kılmaktadır. Çalışma, insan ve çeşitli hayvan serumlarındaki $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinleri presipite etmek için gerekli presipitasyon ayraçlarının (dekstran sülfat/ MnCl_2 , sodyum fosfotungstat/ MgCl_2) konsantrasyonlarını karşılaştırmak üzere gerçekleştirildi. Bu amaçla, ilk olarak insan serum lipoproteinleri ve daha sonra çeşitli hayvan türlerinin serum $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinleri farklı metotlar kullanılarak presipite edildi. Presipite edilen lipoproteinler agaroz jel elektroforez ile tanımlandı. İnsan serumu için kullanılan konsantrasyonda dekstran sülfat/ MnCl_2 'ün tüm hayvan türlerinin serum $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinlerini tam olarak presipite ettiği belirlendi. Sodyum fosfotungstat/ MgCl_2 presipitasyon metodu ile, keçi ve koyun serum $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinleri insan serumu için gerekli olandan 2 kat daha fazla sodyum fosfotungstat/ MgCl_2 ile presipite edildi. Diğer hayvan türlerinde ise, aynı konsantrasyondaki sodyum fosfotungstat/ MgCl_2 ile presipite edildi. Serum $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteinlerin presipitasyonu için kullanılan polianyon/divalent katyonların konsantrasyonlarının insan ve çeşitli hayvan türleri arasında farklılık gösterdiği ve türler arasındaki mevcut farklılıkların, muhtemelen lipoproteinlerin türler arasındaki lipid kompozisyonları ve yüzey yük yoğunluklarındaki değişikliklerden kaynaklandığı sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Lipoprotein izolasyonu, presipitasyon, polianyon, divalent katyon, serum

Comparative Isolation of Serum $\beta + \text{pre-}\beta$ Lipoproteins of Human and Various Domestic Animal Species by Dextran Sulfate/ MnCl_2 and Sodium Phosphotungstate/ MgCl_2 Precipitation Methods

Abstract: Lipoproteins are water-soluble complexes through which various lipids are transported between the various tissues for storage and utilization. Association of lipoproteins with risk of coronary heart disease and various types of dyslipoproteinemias necessitate the quantification of the individual lipoprotein classes. The study was undertaken to compare the concentrations of precipitation reagents (dextran sulfate/ MnCl_2 , sodium phosphotungstate/ MgCl_2) necessary in order to precipitate $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteins in human and various animal sera. To this end, the serum $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteins of human and various animal species were precipitated using various methods. The lipoproteins precipitated were separated and identified by agarose gel electrophoresis. Dextran sulfate/ MnCl_2 at the concentration used for human serum resulted in complete precipitation of $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoprotein of sera from all animal species. In the sodium phosphotungstate/ MgCl_2 precipitation method, $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteins of goat and sheep were precipitated by two times more sodium phosphotungstate/ MgCl_2 than that required for human serum $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteins. Also in other animal species $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoproteins were precipitated by the same sodium phosphotungstate/ MgCl_2 concentration. It was concluded that the concentrations of polyanion/divalent cation 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' surfaces as well as to dissimilarities in lipid compositions of the lipoproteins between species.

Key Words: Lipoprotein isolation, precipitation, polyanion, divalent cation, serum.

* Bu çalışma Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu (FÜNAF) tarafından desteklenmiştir. FÜNAF Proje No: 262. Doktora tezinin bir kısmından alınmıştır.

Giriş

Plazma lipoproteinleri, spesifik proteinler (apolipoproteinler) ve lipidler (kolesterol, kolesteril esterleri, fosfolipidler ve triağilgliseroller) içeren suda çözünür komplekslerdir (1-3). Boyut, kimyasal kompozisyon ve dansite farklılıkları lipoproteinlerin separasyonlarını mümkün kılmaktadır (4). Plazma lipoproteinleri elektroforetik mobilitelerine göre, şilomikronlar (orjinde kalır), pre- β (VLDL: Çok Düşük Dansiteli Lipoproteinler), β (LDL: Düşük Dansiteli Lipoproteinler) ve α (HDL: Yüksek Dansiteli Lipoproteinler) lipoproteinler olarak sınıflandırılmaktadırlar (2).

Lipoproteinlerin, insanda koroner arter hastalığı riski ve çeşitli dislipoproteinemiler ile ayrıca hem insanda hem de hayvanlarda lipid metabolizmasının değişik hastalıkları ile (ketozis, hepatik lipidozis, pankreatitis, diabetes mellitus v.b.) olan bağlantısı farklı lipoprotein sınıflarının miktar tayinlerini ve kompozisyonel analizlerini gerekli kılmaktadır. Bu analizler, bu tür lipid bağlantılı hastalıkların teşhisinde büyük öneme sahiptir (5,6). Lipoprotein sınıflarının bu amaçlarla izolasyonu için çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Lipoproteinler; ultrasantrifügasyon, polianyon/divalent katyonlar ile presipitasyon, elektroforezis, kolon kromatografisi veya immunolojik teknikler ile serum ya da plazmadan izole edilebilmektedirler (5). En sık kullanılan lipoprotein separasyon tekniklerinden biri de presipitasyon yöntemidir. Presipitasyon yöntemi, kolaylığı, kısa sürede tamamlanabilmesi ve ucuzluğu sebebiyle sıkça kullanılmaktadır. Lipoproteinlerin, heparin, dekstran sülfat ve sodyum fosfotungstat gibi polianyonlar ve nötral polimerler ile moleküler kompleksler meydana getirebilme özelliklerinden yararlanılarak lipoproteinlerin serumdan presipitasyon yolu ile izolasyonları sağlanmaktadır (7). Günümüzde HDL-kolesterol analizi için sık kullanılan metotlardan biri polianyon/divalent katyonlar ile apo B içeren lipoproteinlerin (β +pre- β) presipitasyonudur. Presipitasyon sonrası süpernatantda HDL-kolesterolünün enzimatik analizi yapılmaktadır.

İnsan plazmasından lipoproteinlerin izolasyonları için geliştirilen tekniklerin, lipoprotein sınıflarının konsantrasyon ve kompozisyonlarının türler arasında farklılıklar göstermesi nedeniyle her tür için geçerli olmayabileceği ileri sürülmektedir (8,9). Hayvanlarda lipoproteinler konusunda yapılan çoğu çalışmada insan

lipoproteinlerini izole etmek için geliştirilen teknikler kullanılmaktadır (10). Türler arasında karşılaştırmaya yönelik yeterli sayıda araştırmaya rastlanılmamaktadır.

Bu amaçla, insan serum β +pre- β lipoproteinlerinin izolasyonları için kullanılan dekstran sülfat/MnCl₂ ve sodyum fosfotungstat/MgCl₂ presipitasyon yöntemleri aynı amaçla bazı hayvan türlerinin serumuna uygulandı. Presipite edilen lipoprotein fraksiyonları agaroz jel elektroforez ile tanımlendi. İnsan ve hayvan serum β +pre- β lipoproteinlerinin izolasyonları için gerekli polianyon/divalent katyon konsantrasyonları karşılaştırıldı.

Materyal ve Metot

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 dakika pıhtılaşmaya bırakıldı. Takiben, 2500 rpm'de 15 dakika oda ısısında santrifüj edilerek serumlar ayrıldı ve aynı gün içinde analizleri yapıldı.

Dekstran Sülfat/MgCl₂.6H₂O ile serum β +pre- β lipoproteinlerinin presipitasyonu Burstein ve ark. (11)'nin metoduna göre gerçekleştirildi. Presipitatlar 0,25 ml 0,5 M sodyum sitrat ve 1 ml 0,15 M NaCl'de çözüldü. Çözülen presipitat 1 gece +4 °C'de NaCl/azid (8,77g NaCl, 0,13 g sodyum azid, 0,372 g Na₂EDTA 1 litreye tamamlandı pH 7,3'e ayarlandı) çözeltisine karşı diyaliz yapıldı. Bu şekilde sodyum sitrat ve Mn⁺² çözünen presipitatdan uzaklaştırıldı (8).

Fosfotungstik asit/MgCl₂ ile serum β +pre- β lipoproteinlerinin presipitasyonu amacıyla Warnick ve Albers (12)'in metodu uygulandı. Presipitatlar, 1 ml 240 mM Na₂CO₃ ve 150 mM NaCl karışımında çözüldü (13).

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

Lipoproteinlerin agaroz jel elektroforezi Hoefler jel elektroforez ünitesi (Hoefler SE 250 Hoefler Scientific Instruments, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Konsantre olan 75 ml'lik stok tampon (0,06M tris, 0,01M barbital, 0,05M sodyum barbital, 0,0015M sodyum azid) 1000ml'ye distile su ile tamamlandı (pH 8,6) ve elektrot tamponu olarak kullanıldı (14).

%0,8'lik 1,5 mm kalınlığındaki 2 jel için 0,2 g agaroz 25 ml barbital tamponda kaynatılarak eritildi ve 45-50 °C'ye kadar soğutuldu. Aynı ısıya getirilen jel döküm ünitesine bir enjektör yardımıyla dökülerek 1,5 mm'lik taraklar yerleştirildi. + 4 °C'de 2 saat bekletildi. 15 mA/jel'de (sabit amper) yaklaşık 36 V'da 1 saat 30 dakika elektroforez işlemi sürdürüldü. İnsan serumundan kuyucuklara direkt olarak 9 µL ve diğer hayvan türlerinin serumlarından 15 µL ilave edildi.

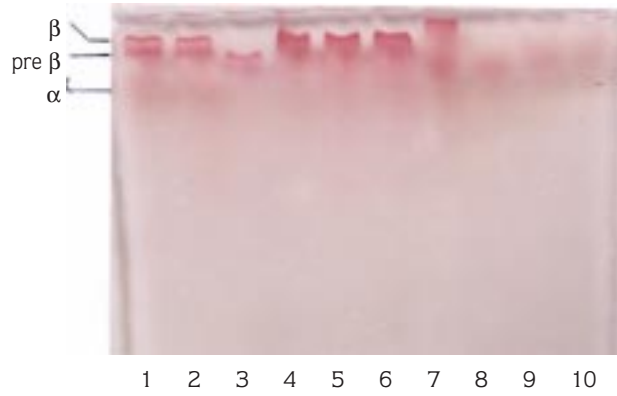
Presipitatlar ve süpernatantlar ise kuyucuklara yerleştirilmeden önce örnek tamponuyla (16 ml barbital tampon (pH 8,6), 5 ml gliserol, 0,1 ml %1 brom fenol blue 50 ml' ye distile su ile tamamlandı.) muamele edildi.

100 µL presipitat ve 200 µL süpernatant için 50 µL örnek tampon çözeltisi ilave edildi. Kuyucuklara insan serum lipoprotein presipitatlarından 15µL, süpernatantlarından 20 µL, diğer hayvan türlerinin serum lipoprotein presipitat ve süpernatantlarından 40 µL ilave edildi. Her jelin ilk kuyucuğuna insan serumu referans olarak uygulandı.

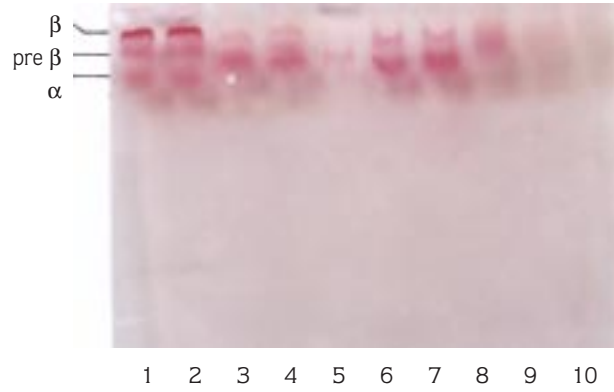
Elektroforez sonrası jeller, etanol/asetik asit/su 60: 10: 30 (v/v) karışımında 10 dakika fikze edildi. Fiksasyon sonrası 30 dakika 60 °C'de kurutuldu. Kuruyan jeller Fat Red 7B boyasında boyandı (15,16). Jeller distile su/metanol (4: 1, v/v) karışımında 1 gece bekletildi (17) ve fotoğrafları çekildi.

Bulgular

İnsan ve çeşitli hayvan türlerinin dekstran sülfat/MnCl₂ ve sodyum fosfotungstat/MgCl₂ yöntemleri ile presipite edilen serum β+pre-β lipoproteinlere (presipitat) ve presipite olmayan lipoproteinlere (süpernatant) ait agaroz jel elektroforegramları Şekil 1-22'de görülmektedir. Ayrıca hem presipitat ve hem de süpernatantda agaroz jel elektroforez ile analizler sonucunda jel üzerinde tespit edilen lipoproteinler +, tespit edilemeyenler ise – şeklinde göz ile değerlendirilerek oluşturulan veriler Tablo 1 ve 2'de belirtildi. Ayrıca Tablo 3'de insan ve diğer hayvan



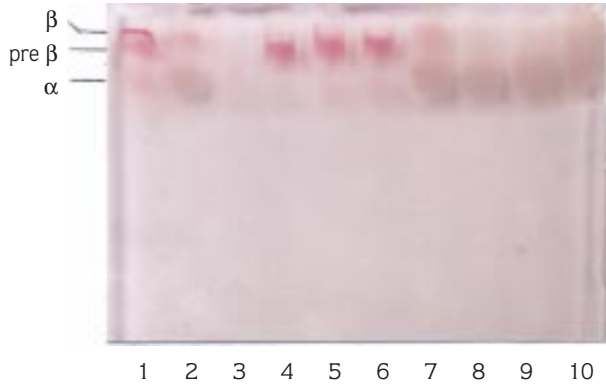
Şekil 1. Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen İnsan serum β+pre-β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1,2: İnsan serumu 3: DS presipitat (x0.5) 4: DS presipitat (x1) 5: DS presipitat (x2) 6: DS presipitat (x3) 7: DS süpernatant (x0.5) 8: DS süpernatant (x1) 9: DS süpernatant (x2) 10: DS süpernatant (x3)



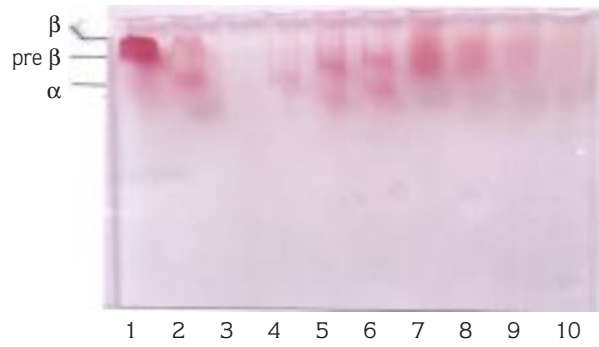
Şekil 2. Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Siğir serum β+pre-β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1,2: İnsan serumu 3,4: Siğir serumu 5: DS presipitat (x1) 6: DS presipitat (x2) 7: DS presipitat (x3) 8: DS süpernatant (x1) 9: DS süpernatant (x2) 10: DS süpernatant (x3)

türlerinde en etkin presipitasyonu sağlayan ayıraç konsantrasyonları sunuldu.

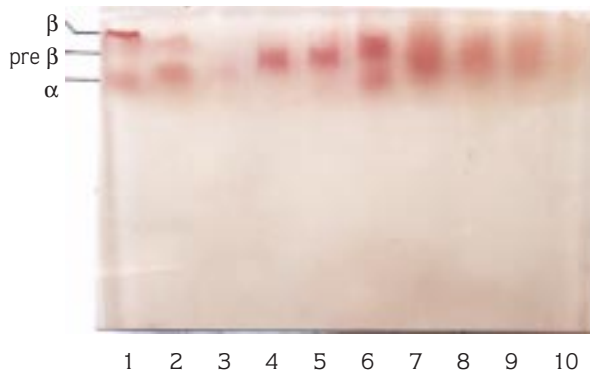
Dekstran Sülfat/MnCl₂ Presipitasyon Yöntemi ile Serum β+pre-β Lipoproteinlerinin İzolasyonları: İnsan ve diğer hayvan türlerinin serum β+pre-β lipoproteinleri x1 konsantrasyondaki dekstran sülfat/MnCl₂ ile (0,028mM DS/0,047M MnCl₂) tam olarak presipite edildi. Ayıraçın x0,5 konsantrasyonunda (0,0145mM DS/0,024M MnCl₂) presipitatda az belirgin bir β+pre-β bandı gözlenirken, süpernatantda henüz presipite olmamış β+pre-β lipoproteinlerin varlığı belirlendi. Artan



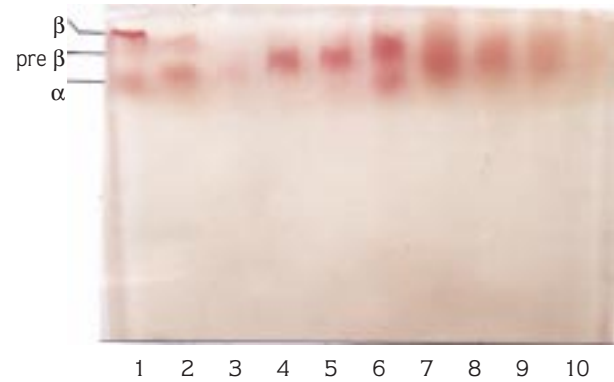
Şekil 3. Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Koyun serum β +pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu 2: Koyun serumu 3: DS presipitat (x0.5) 4: DS presipitat (x1) 5: DS presipitat (x2) 6: DS presipitat (x3) 7: DS süpernatant (x0.5) 8: DS süpernatant (x1) 9: DS süpernatant (x2) 10: DS süpernatant (x3)



Şekil 5. Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Kedi serum β +pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu 2: Kedi serumu 3: DS presipitat (x0.5) 4: DS presipitat (x1) 5: DS presipitat (x2) 6: DS presipitat (x3) 7: DS süpernatant (x0.5) 8: DS süpernatant (x1) 9: DS süpernatant (x2) 10: DS süpernatant (x3)



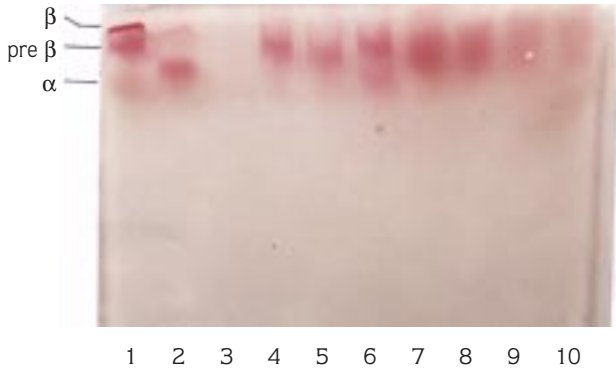
Şekil 4. Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Keçi serum β +pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu 2: Keçi serumu 3: DS presipitat (x0.5) 4: DS presipitat (x1) 5: DS presipitat (x2) 6: DS presipitat (x3) 7: DS süpernatant (x0.5) 8: DS süpernatant (x1) 9: DS süpernatant (x2) 10: DS süpernatant (x3)



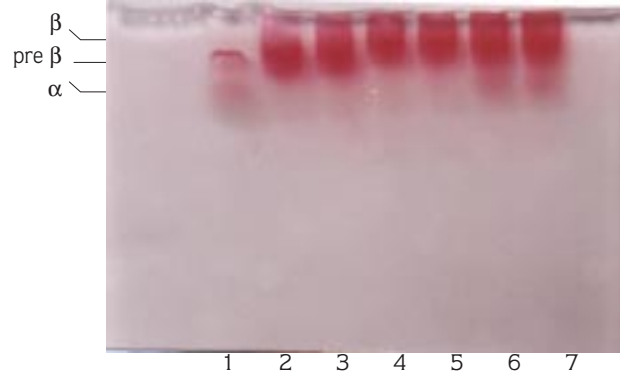
Şekil 6. Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Köpek serum β +pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu 2: Köpek serumu 3: DS presipitat (x0.5) 4: DS presipitat (x1) 5: DS presipitat (x2) 6: DS presipitat (x3) 7: DS süpernatant (x0.5) 8: DS süpernatant (x1) 9: DS süpernatant (x2) 10: DS süpernatant (x3)

ayraç konsantrasyonu ile birlikte presipitatda β +pre- β lipoproteinlerin bantlarının yanında α lipoprotein bantları da görülmektedir (Şekil 1-8). Ayıraçın x3 konsantrasyonunun (0,077mM DS/1,28M MnCl₂) kullanıldığı tüm örneklerin presipitatlarında α lipoproteinler tespit edildi. Artan ayıraç konsantrasyonları ile birlikte presipitatlarda artan α bant yoğunluğuna karşın süpernatantlarda bu bantın yoğunluğu azalmaktadır. İnsan serum örneklerinde β ve pre- β lipoproteinler ayrı bantlar halinde gözlemlenirken, hayvan türlerinde bu ayırım gerçekleşmedi.

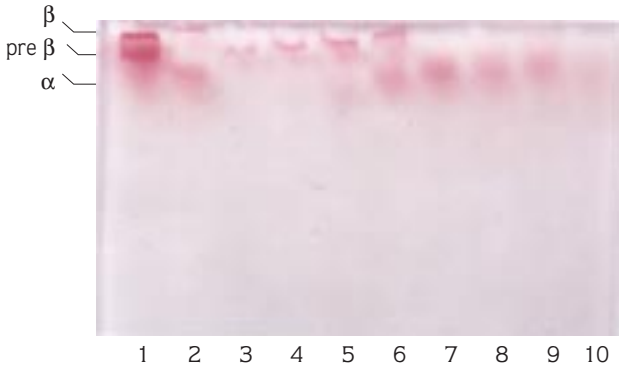
Sodyum Fosfotungstat/MgCl₂ Presipitasyon Yöntemi ile Serum β +pre- β Lipoproteinlerinin İzolasyonları: Koyun ve keçi haricinde insan ve diğer hayvan türlerinin serum β +pre- β lipoproteinleri x1 konsantrasyondaki sodyum fosfotungstat/MgCl₂ (1,15mM NaphT/0,04M MgCl₂) ile tam olarak presipite edildi. Bu örneklerde α lipoprotein kontaminasyonu gözlenmedi. Artan ayıraç konsantrasyonu ile birlikte (x3) presipitatlarda α lipoproteinler belirlendi. Koyun ve keçi serum β +pre- β lipoproteinlerinin, x1 ayıraç konsantrasyonu kullanıldığında çok az bir kısmı presipite



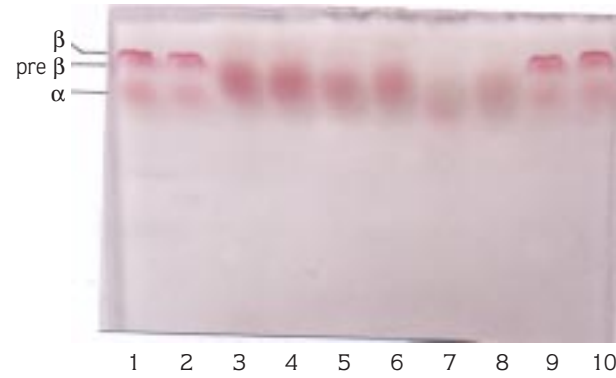
Şekil 7. Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen At serum β +pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu **2:** At serumu **3:** DS presipitat (x0.5) **4:** DS presipitat (x1) **5:** DS presipitat (x2) **6:** DS presipitat (x3) **7:** DS süpernatant (x0.5) **8:** DS süpernatant (x1) **9:** DS süpernatant (x2) **10:** DS süpernatant (x3)



Şekil 9. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen İnsan Serum β +pre- β Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu **2,3:** NaphT presipitat (x1) **4,5:** NaphT presipitat (x2) **6,7:** NaphT presipitat (x3)



Şekil 8. Dekstran Sülfat (DS) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Tavuk serum β +pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu **2:** Tavuk serumu **3:** DS presipitat (x0.5) **4:** DS presipitat (x1) **5:** DS presipitat (x2) **6:** DS presipitat (x3) **7:** DS süpernatant (x0.5) **8:** DS süpernatant (x1) **9:** DS süpernatant (x2) **10:** DS süpernatant (x3)



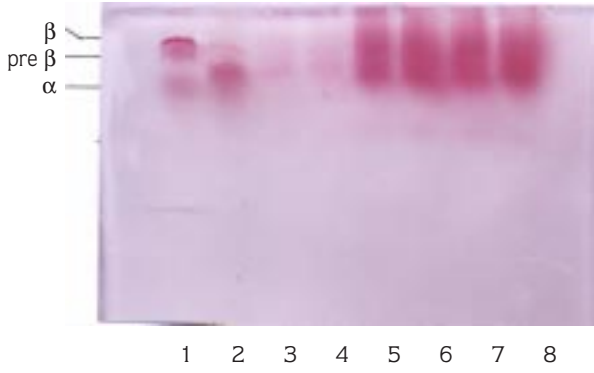
Şekil 10. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen İnsan Serum α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1,2: İnsan serumu **3,4:** NaphT süpernatant (x1) **5,6:** NaphT süpernatant (x2) **7,8:** NaphT süpernatant (x3) **9,10:** İnsan serumu

oldu ve agaroz jel elektroforegramda bantlar az belirgin olarak görüldü. Ayıraç x2 konsantrasyonda (1,97 mM NaphT/0,071M $MgCl_2$) kullanıldığında elektroforegramda β +pre- β bandı koyulaşırken, α lipoproteinlerin kopresipitasyonu gözlenmemektedir. Ayıracın x3 konsantrasyonunda (2,58mM NaphT/0,093M $MgCl_2$) ise β +pre- β lipoproteinler ile birlikte presipite olan α lipoprotein bantları belirgindir. Koyun ve keçide α lipoprotein kopresipitasyonu olmaksızın β +pre- β lipoproteinlerin tam olarak presipitasyonunu sağlayan sodyum fosfotungstat/ $MgCl_2$ konsantrasyonu x2 olarak

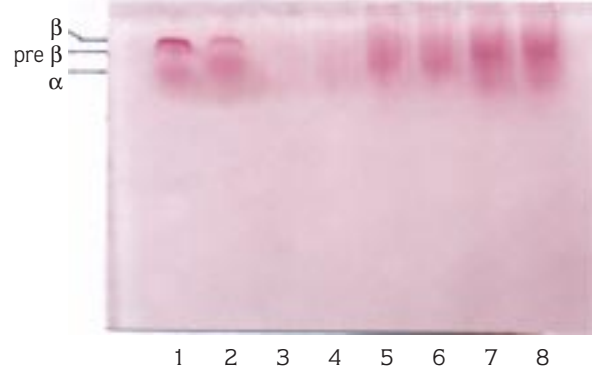
belirlendi. Artan ayıraç konsantrasyonuna bağlı olarak süpernatantda da α lipoproteinlerin yoğunluğunda azalma belirlendi. β ve pre- β lipoprotein bantlarının tam rezolüsyonu insan haricindeki türlerde gözlenemedi (Şekil 9-22).

Tartışma

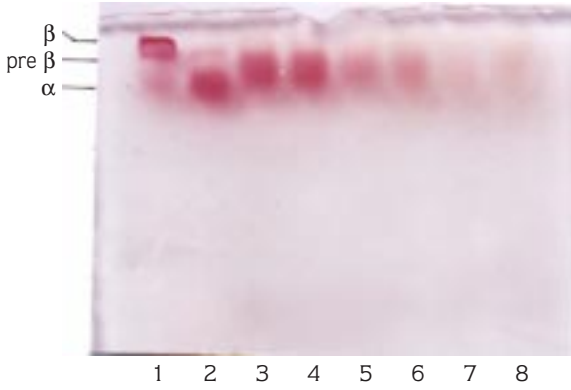
Dekstran sülfat/ $MnCl_2$ ve sodyum fosfotungstat/ $MgCl_2$ presipitasyon metotları ile bazı hayvan türlerinin serum β +pre- β lipoproteinlerinin tam olarak presipitasyonu için gerekli ayıraç konsantrasyonları, insanda kullanılan ayıraç konsantrasyonu ile karşılaştırılarak tespit edildi. Bu



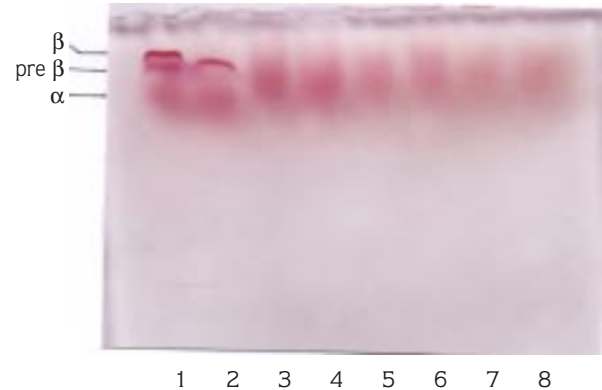
Şekil 11. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Sığır Serum β +pre- β Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu 2: Sığır serumu 3,4: NaphT presipitat (x1) 5,6: NaphT presipitat (x2) 7,8: NaphT presipitat (x3)



Şekil 13. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Koyun Serum β +pre- β Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu 2: Koyun serumu 3,4: NaphT presipitat (x1) 5,6: NaphT presipitat (x2) 7,8: NaphT presipitat (x3)



Şekil 12. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Sığır Serum α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu 2: Sığır serumu 3,4: NaphT süpernatant (x1) 5,6: NaphT süpernatant (x2) 7,8: NaphT süpernatant (x2)

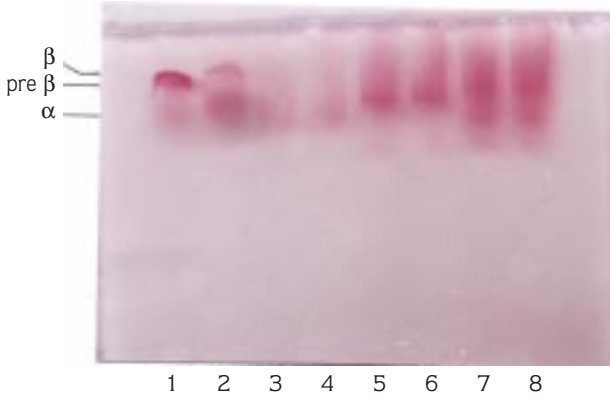


Şekil 14. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Koyun Serum α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu 2: Koyun serumu 3,4: NaphT süpernatant (x1) 5,6: NaphT süpernatant (x2) 7,8: NaphT süpernatant (x2)

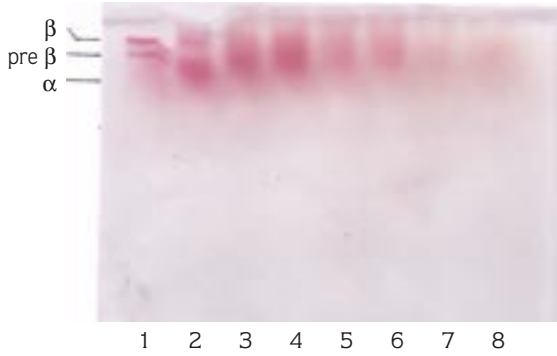
doğrultuda, dekstran sülfat/ $MnCl_2$ presipitasyon metodunda insandaki ayıraç konsantrasyonu (x1) incelenen hayvan türleri için de geçerli olurken, sodyum fosfotungstat/ $MgCl_2$ presipitasyon metodunda koyun ve keçi haricinde, diğer hayvan türlerinde insandaki ayıraç konsantrasyonu (x1) β +pre- β lipoproteinlerinin tam bir presipitasyonunu sağladı. Aynı amaçla, koyun ve keçide insan serumu için kullanılan fosfotungstat/ $MgCl_2$ konsantrasyonunun iki katının bu lipoprotein fraksiyonlarını tam olarak presipite ettiği belirlendi.

Dekstran sülfat (DS) her glikoz molekülüne bağlı 3 sülfat grubuyla yaklaşık %17 kükürt içeren heparin

benzeri bir polisakarittir. DS, heparinin sentetik bir analogudur ve lipoprotein presipitasyonunda yıllardır oldukça fazla kullanılan heparin/ $MnCl_2$ presipitasyon metodu ile iyi bir korelasyon sergilediği bildirilmektedir. DS'in molekül ağırlığı 4000-500.000 arasında değişmektedir. Aynı zamanda bir polianyon olan DS üzerindeki negatif yüklü grupların, lipoproteinlerin apolipoproteinleri üzerindeki pozitif yüklü gruplarla etkileşime girdiği ve divalent metal iyonlarının (Mn^{+2} vb.) da lipoproteinlerdeki negatif yüklü gruplarla (fosfolipidler gibi) birleşerek suda çözünmez kompleks oluşumunu kolaylaştırdığı ileri sürülmektedir (18).

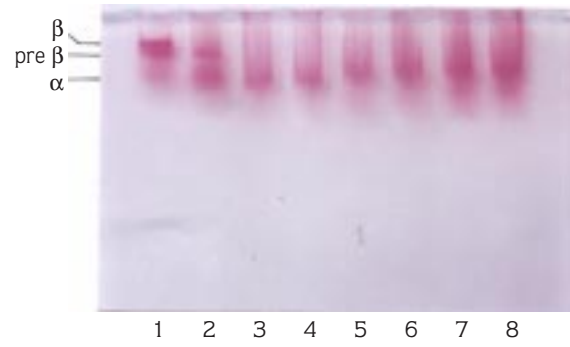


Şekil 15. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Keçi Serum β +pre- β Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu **2:** Keçi serumu **3,4:** NaphT presipitat (x1)
5,6: NaphT presipitat (x2) **7,8:** NaphT presipitat (x3)

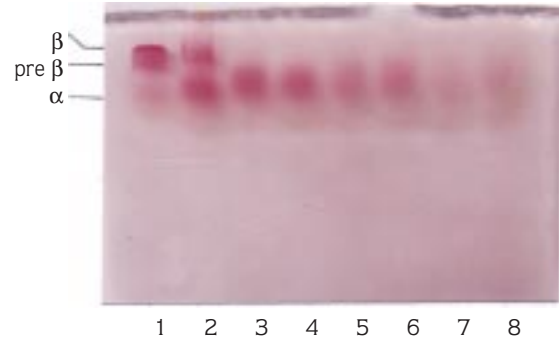


Şekil 16. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Keçi Serum α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu **2:** Keçi serumu **3,4:** NaphT süpernatant (x1) **5,6:** NaphT süpernatant (x2) **7,8:** NaphT süpernatant (x2)

İnsan serum lipoproteinlerinin separasyonu için 1970'de Burstein ve ark. (11) molekül ağırlığı 15.000 DS ve $MnCl_2$ ile presipitasyon işlemi tanımlamışlardır. Bu ayırıcıların düşük konsantrasyonlarının, apo B içeren serum lipoproteinlerini presipite ettiğini belirlemişlerdir ve bunun hem daha yüksek hem de daha düşük molekül ağırlıklı DS'a göre daha elverişli olduğuna karar vermişlerdir. Oysa, Warnick ve ark. (18) molekül ağırlığı 15.000 olan DS/ $MgCl_2$ ile LDL/VLDL'in tam olarak presipitasyonunu sağlayamamışlardır. Mevcut çalışmada da, Burstein ve ark.'nın metodu kullanıldı ve benzer şekilde apo B içeren serum lipoproteinleri tam olarak presipite edildi.

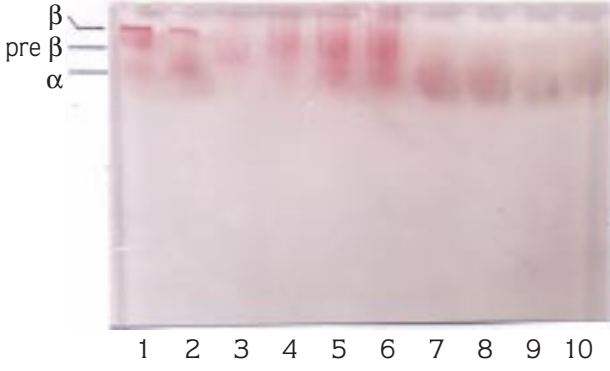


Şekil 17. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Kedi Serum β +pre- β Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu **2:** Kedi serumu **3,4:** NaphT presipitat (x1)
5,6: NaphT presipitat (x2) **7,8:** NaphT presipitat (x3)

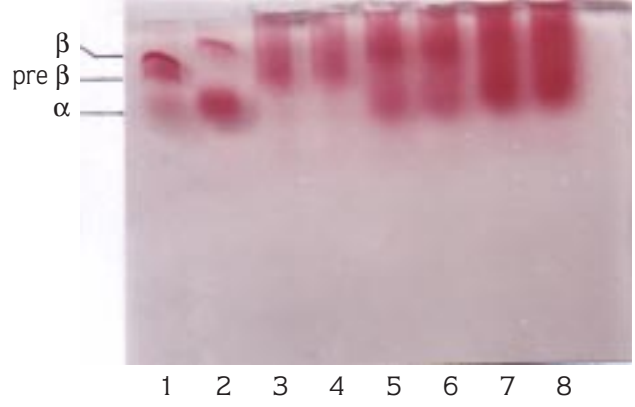


Şekil 18. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Kedi Serum α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu **2:** Kedi serumu **3,4:** NaphT süpernatant (x1) **5,6:** NaphT süpernatant (x2) **7,8:** NaphT süpernatant (x2)

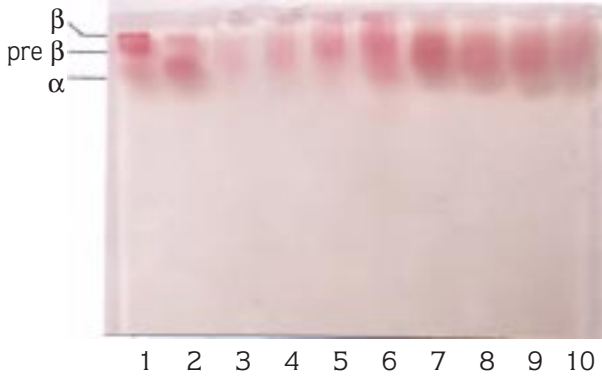
Hayvan serum β +pre- β lipoproteinlerinin separasyonunda da dekstran sülfat ile presipitasyon metotları kullanıldı. Sığır serum β +pre- β lipoproteinleri Herdt ve ark. (19) tarafından %10 DS ve 1 M $CaCl_2$ ile presipite edildi. Fakat kullanılan işlemde DS'in molekül ağırlığı belirtilmediğinden tam bir konsantrasyon karşılaştırılması yapılamadı. Aynı şekilde Özpınar ve ark. (20)'da %10 DS (MA 5000) ve 1 M $CaCl_2$ (0,042 mM DS/0,011M $CaCl_2$) ile sığır serum β +pre- β lipoproteinlerini presipite etmişlerdir. Mevcut çalışmadakinin (0,028 mM DS) 1,5 katı DS konsantrasyonuna (0,042 mM DS) karşılık polianyon olarak 0,047 M $MnCl_2$ yerine ~1/4 oranında $CaCl_2$ (0,011 M) kullanılmıştır. DS'in artan



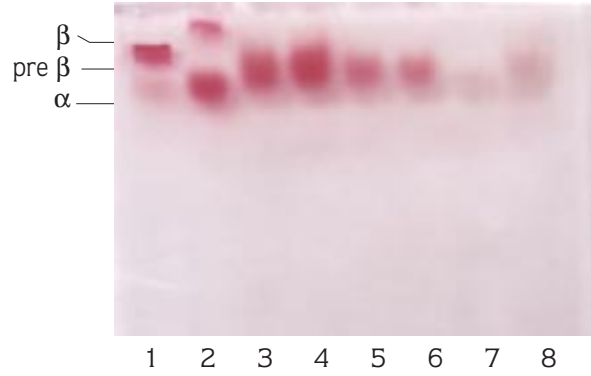
Şekil 19. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Köpek Serum β +pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu 2: Köpek serumu 3: NaphT presipitat (x0.5) 4: NaphT presipitat (x1) 5: NaphT presipitat (x2) 6: NaphT presipitat (x3) 7: NaphT süpernatant (x0.5) 8: NaphT süpernatant (x1) 9: NaphT süpernatant (x2) 10: NaphT süpernatant (x3)



Şekil 21. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Tavuk Serum β +pre- β Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu 2: Tavuk serumu 3,4: NaphT presipitat (x1) 5,6: NaphT presipitat (x2) 7,8: NaphT presipitat (x3)



Şekil 20. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen At Serum β +pre- β ve α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu 2: At serumu 3: NaphT presipitat (x0.5) 4: NaphT presipitat (x1) 5: NaphT presipitat (x2) 6: NaphT presipitat (x3) 7: NaphT süpernatant (x0.5) 8: NaphT süpernatant (x1) 9: NaphT süpernatant (x2) 10: NaphT süpernatant (x3)



Şekil 22. Sodyum Fosfotungstat (NaphT) Presipitasyon Metodu ile İzole Edilen Tavuk Serum α Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramı
1: İnsan serumu 2: Tavuk serumu 3,4: NaphT süpernatant (x1) 5,6: NaphT süpernatant (x2) 7,8: NaphT süpernatant (x2)

konsantrasyonu düşük molekül ağırlıklı olmasına bağlanabilir. Çünkü, daha büyük molekül ağırlıklı DS lipoproteinleri presipite etmeye daha fazla eğilimlidir (18). Köpek serum β +pre- β lipoproteinleri %5 Dextrarine (200mg dekstran sülfat içeren 2 ml ampül) ve %11 $CaCl_2$ ile (21) ve %2DS (MA 50.000), 1M $MgCl_2$ presipitasyon metotları ile presipite edilerek HDL kolesterol değerlerine bakılmıştır (22). Köpek serum lipoproteinleri için kullanılan 2 metotda da DS preparatları ve polianyonlar farklı olduklarından konsantrasyonların karşılaştırılması yapılamadı. Sjoblom

ve Eklund (23) insan serumunda HDL2 kolesterolünün ölçümü amacıyla DS (500.000)/ $MgCl_2$ presipitasyon metodunu rat plazması için uyarlamışlardır. Bu amaçla, serum VLDL, LDL ve HDL1 lipoprotein fraksiyonları DS/ $MgCl_2$ ile çöktürülüp süpernatantda kalan HDL2 kolesterolü ölçülmüştür. İnsan ve rat plazmasında VLDL, LDL ve HDL1 lipoprotein fraksiyonlarını çöktürmek için gerekli DS/ $MgCl_2$ konsantrasyonları karşılaştırılmış ve aynı lipoprotein fraksiyonlarının çöktürülmesi için ratlarda insan plazması için kullanılan daha fazla konsantrasyonda $MgCl_2$ kullanılması gerektiğini tespit etmişlerdir. Mevcut farklılığı, her iki türün lipoprotein kompozisyonundaki farklılığa bağlamışlardır.

Tablo 1. DS/MnCl₂ ve NahT/MgCl₂ Presipitasyon Yöntemleri ile İzole Edilen İnsan, Sığır, Koyun ve Keçi Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramlarındaki Bant Yoğunluklarının Gözle Değerlendirilmesi

| | | DEKSTRAN SÜLFAT/MnCl ₂ | | | | SODYUM FOSFOTUNGSTAT/MgCl ₂ | | | | |
|-------|------|-----------------------------------|---|-------------|---|--|------|-------------|------|---|
| | | PRESİPİTAT | | SÜPERNATANT | | PRESİPİTAT | | SÜPERNATANT | | |
| | | β+pre-β | α | β+pre-β | α | β+pre-β | α | β+pre-β | α | |
| İnsan | x0.5 | + | - | + | + | | | | | |
| | x1 | + | - | - | + | x1 | + | - | - | + |
| | x2 | + | + | - | + | x2 | + | - | - | + |
| Sığır | x3 | + | + | - | + | x3 | + | + | - | + |
| | x1 | + | - | - | + | x1 | + | - | +(?) | + |
| | x2 | + | + | - | + | x2 | + | + | - | + |
| Koyun | x3 | + | + | - | + | x3 | + | + | - | + |
| | x0.5 | - | - | + | + | | | | | |
| | x1 | + | - | - | + | x1 | +(?) | - | +(?) | + |
| Keçi | x2 | + | + | - | + | x2 | + | - | - | + |
| | x3 | + | + | - | + | x3 | + | + | - | + |
| | x0.5 | + | - | + | + | | | | | |
| Keçi | x1 | + | - | - | + | x1 | + | - | +(?) | + |
| | x2 | + | - | - | + | x2 | + | - | - | + |
| | x3 | + | + | - | + | x3 | + | + | - | + |

Tablo 2. DS/MnCl₂ ve NahT/MgCl₂ Presipitasyon Yöntemleri ile İzole Edilen Kedi, Köpek, At ve Tavuk Serum Lipoproteinlerinin Agaroz Jel Elektroforegramlarındaki Bant Yoğunluklarının Gözle Değerlendirilmesi

| | | DEKSTRAN SÜLFAT/MnCl ₂ | | | | SODYUM FOSFOTUNGSTAT/MgCl ₂ | | | | |
|-------|------|-----------------------------------|---|-------------|---|--|---|-------------|------|---|
| | | PRESİPİTAT | | SÜPERNATANT | | PRESİPİTAT | | SÜPERNATANT | | |
| | | β+pre-β | α | β+pre-β | α | β+pre-β | α | β+pre-β | α | |
| Kedi | x0.5 | - | - | +(?) | + | | | | | |
| | x1 | + | - | - | + | x1 | + | - | - | + |
| | x2 | + | + | - | + | x2 | + | + | - | + |
| Köpek | x3 | + | + | - | + | x3 | + | + | - | + |
| | x0.5 | + | - | + | + | x0.5 | + | - | - | + |
| | x1 | + | - | - | + | x1 | + | - | - | + |
| At | x2 | + | + | - | + | x2 | + | + | - | + |
| | x3 | + | + | - | + | x3 | + | + | - | + |
| | x0.5 | - | - | +(?) | + | x0.5 | + | - | +(?) | + |
| Tavuk | x1 | + | - | - | + | x1 | + | - | - | + |
| | x2 | + | - | - | + | x2 | + | +(?) | - | + |
| | x3 | + | + | - | + | x3 | + | + | - | + |
| Tavuk | x0.5 | + | - | + | + | | | | | |
| | x1 | + | - | - | + | x1 | + | - | - | + |
| | x2 | + | + | - | + | x2 | + | + | - | + |
| Tavuk | x3 | + | + | - | + | x3 | + | + | - | + |

Tablo 3. İnsan ve Çeşitli Hayvan Türlerinde Serum β +pre- β Lipoproteinlerini Tam Olarak Presipite Etmek İçin Gerekli İdeal Ayıraç Konsantrasyonları^a

| | DEKSTRAN SÜLFAT (DS) | SODYUM FOSFOTUNGSTAT (NaphT) |
|-------|-------------------------|---------------------------------|
| İNSAN | x1 | x1 |
| SIĞIR | x1 | x1 |
| KOYUN | x1 | x2 |
| KEÇİ | x1 | x2 |
| KEDI | x1 | x1 |
| KÖPEK | x1 | x1 |
| AT | x1 | x1 |
| TAVUK | x1 | x1 |

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

Günümüzde, HDL kolesterol analizi için Avrupa'da çok sıkça kullanılan metot fosfotungstik asit (PhT)/MgCl₂ ile apo B içeren lipoproteinlerin presipitasyonudur (24). PhT'in heparin gibi nisbi yüksek molekül ağırlığı ve negatif yükü sebebiyle lipoproteinlerle kompleks teşkil ettiği ileri sürülmüş, fakat sülfatlanmış polisakkaritlerden farklı olarak serumun iyonik gücünün artırılmasıyla bu kompleksin bozulmadığı bildirilmiştir (7). Presipitasyon sonrası süpernatant'da HDL-kolesterolün enzimatik analizi yapılmıştır. PhT / MgCl₂, HDL'i çok az miktarda kopresipite ettiği ve triaçilgliserol düzeyi yüksek serumlarda apo B içeren lipoproteinlerin tam bir presipitasyonunu sağladığı ortaya konulmuştur (24).

İnsanlarda geniş çaplı kullanılmasına rağmen, NaphT/MgCl₂ ile presipitasyon işlemi hayvan türlerinde genellikle ultrasantrifüj ile kombine olarak kullanılmıştır. Köpek serum β +pre- β lipoproteinleri ultrasantrifügasyon/NaphT/MgCl₂ presipitasyon metodu ile izole edilmiştir (22,25-27). Kedi serum lipoproteinlerinin de ultrasantrifüj ile şilomikron ve VLDL'leri uzaklaştırıldıktan sonra fosfotungstat/Mg⁺⁺ ile LDL'leri presipite edilmiştir (28). Domuz serumundan elde edilen farklı lipoprotein fraksiyonları preparatif ultrasantrifüj ile saflaştırmayı takiben fosfotungstat presipitasyonu ile izole edilmiştir (29). Ancak bu çalışmalarda şilomikronlar ve/veya VLDL ultrasantrifügasyonla serumdan uzaklaştırılıp daha sonra polianyonlarla LDL presipite edildiğinden kullanılan ayıraç

konsantrasyonunu mevcut çalışmanınki ile karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Yapılan çalışmada, insan ve diğer hayvan türlerinin serum β +pre- β lipoproteinleri NaphT/MgCl₂ (pH 7,4) (12) ile presipite edildi. Koyun ve keçi'de insandakinin 2 katı ayıraç konsantrasyonu tam bir presipitasyon sağlarken, diğerlerinde, insandaki ayıraç konsantrasyonu ile presipitasyon gerçekleştirildi. Bu farklılığın nedeni olarak, insan ve çeşitli hayvan türlerinin serum lipoproteinlerinin yüzde dağılımı arasındaki farklar ve lipoprotein partiküllerinin yüzey yüklerinin yoğunluğundaki farklılıklar ileri sürülebilir. Serum lipoproteinlerinin yüzde dağılımlarına bakıldığında, β +pre- β lipoprotein oranının insanda ~%70 iken koyun ve keçide ~%22 civarında olduğu görülür (30). Buna göre, insan serumundaki β +pre- β lipoproteinlerin çöktürülmesi için gerekli NaphT/MgCl₂ konsantrasyonunun koyun ve keçiden daha fazla olması gerekirdi. Oysa, böyle bir durum söz konusu değildir. Bu β +pre- β lipoproteinlerin yüzey yüklerindeki farklılıklar ayıraç konsantrasyonundaki farklılıkların açıklanmasında daha muhtemel gözükmemektedir. Ayrıca lipoprotein-poliyanon komplekslerinin teşkilinde lipit/protein oranının önemli bir faktör olduğu tespit edilmiştir (31). Buradan hareketle, türler arasında lipoproteinlerin lipit/protein oranlarındaki farklılıklar da rol oynayabilir. Güldür ve İleri (32) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, kullanılan PhT/MgCl₂ (pH 2,5) metodunda, keçi serumunda β +pre- β 'yi çöktürmek için insan serumu için gerekli olan miktardan en az 3 kat fazla ayıraç gerekli olduğu bildirilmiştir. Bu farklılığın da, muhtemelen, insan ve keçi lipoproteinlerinin farklı konsantrasyon ve/veya kompozisyonda şeker grupları içermesiyle açıklanabileceği, fakat bu konuda yapılacak daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu öne sürülmüştür. Oysa mevcut çalışmada, koyun ve keçi lipoproteinleri x2 ayıraç konsantrasyonunda presipite olduğu belirlendi. Bu farklılık söz konusu araştırmada PhT (pH 2,5) metodunun kullanılmasına ve presipitatların pH'sının presipitasyon sonrası pH 7-8'e ayarlanmasına bağlı olabileceği gibi, presipite edilen lipoproteinlerin agaroz jel yerine sellüloz asetat elektroforez ile separe edilmesine de bağlı olabilir.

Sonuç olarak, insanlarda serum β +pre- β lipoproteinlerinin presipitasyonu için kullanılan NaphT/MgCl₂ konsantrasyonunun, koyun ve keçilerde aynı amaçla iki katının kullanılması gerektiği ortaya çıkmıştır. Gerekli DS/MnCl₂ konsantrasyonları bakımından

insan ve hayvan türleri arasında bir farklılık tespit edilememiştir. Aynı amaçla, yaygın olarak kullanılan heparin/MnCl₂ ve polietilen glikolün gerekli

konsantrasyonlarının türler arasında farklılık gösterip göstermediği bu konudaki benzer araştırmalarla aydınlanabilecektir.

Kaynaklar

1. Kaplan, I.V., Levinson, S.S.: Apolipoprotein and Related Testing as Markers for Coronary Artery Disease. *Lab. Med. Inter.* 1998; July: 13-14.
2. Mayes, P.A.: Lipid Transport and Storage. In: *Harper's Biochemistry*, eds. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., Appleton & Lange, California, 1990; 226-234.
3. Scanu, A.M.: Plasma Lipoproteins: An Overview. In: *Biochemistry and Biology of Plasma Lipoproteins*, eds. Scanu, A.M and Spector, A.A., Marcel Dekker, Inc. USA. 1986; 1-9.
4. Brewer, H.B., Gregg, R.E., Hoeg, J.M., Fojo, S.S.: Apolipoproteins and Lipoproteins in Human Plasma: An Overview. *Clin. Chem.* 1988; 34(8B): B4-B8.
5. Naito, H.K.: High-Density Lipoprotein (HDL) Cholesterol. In: *Clinical Chemistry Theory, Analysis and Correlation*, eds. Kaplan, L.A., Pesce, A.J., The C.V. Mosby Company, U.S.A, 1989; 983-991.
6. Griel, L.C., McCarty, R.D.: Blood Serum Lipoproteins: A Review. *J. Dairy Sci.* 1969; 52(8): 1233-1243.
7. Cornwell, D.G., Kruger, F.A.: Molecular Complexes in the Isolation and Characterization of Plasma Lipoproteins. *J. Lipid Res.* 1961; 2(2): 110-134.
8. Barrie, J., Nash, A.S., Watson, T.D.G.: Quantitative Analysis of Canine Plasma Lipoproteins. *J. Small Anim. Practice.* 1993; 34: 226-234.
9. Vitic, J., Stevanoic, J.: Comparative Studies of the Serum Lipoproteins and Lipid in Some Domestic, Laboratory and Wild Animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 1993; 106B (1): 223-229.
10. Robbie, S.M., Janson, C.H., Smith, S.C., O'Connor, J.T.: Equine Serum Lipids: Lipid Composition and Electrophoretic Mobility of Equine Serum Lipoprotein Fractions. *Am. J. Vet. Res.* 1975; 36 (12): 1715-1717.
11. Burstein, M., Scholnick, H.R., Morfin, R. Rogers, W.A., Donovan, E.F., Kociba, G.J.: Rapid Method for the Isolation of Lipoproteins from Human Serum by Precipitation with Polyanions. *J. Lipid Res.* 1970; 11: 583-595.
12. Warnick, G.R., Albers, J.J.: A Comprehensive Evaluation of Heparin-Manganese Procedure for Estimating High Density Lipoprotein Cholesterol. *J. Lipid Res.* 1978; 19: 65-76.
13. Carcelain, G., David, F., Lepage, S., Bonnefant-Rousselot, D., Delattre, J., Leerand, A., Peynet, J., Troupel, S.: Simple Method for Quantifying α -Tocopherol in Low-Density + Very Low Density Lipoproteins and In High-Density Lipoproteins. *Clin. Chem.* 1992; 38 (9): 1792-1795.
14. Sparks, D.L., Phillips, M.C.: Quantitative Measurement of Lipoprotein Surface Charge by Agarose Gel Electrophoresis. *J. Lipid Res.* 1992; 33: 123-130.
15. Bahler, R.C., Oppl, J.J., Waggoner, D.M.: Lipoproteins in Patients with Proved Coronary Artery Disease: Quantitative Changes in Agarose Gel Electrophoretic Patterns. *Circulation*, 1980; 62 (6): 1212-1220.
16. Naito, H.K.: Lipoprotein Electrophoresis. In: *Clinical Chemistry Theory, Analysis and Correlation*, eds. Kaplan, L.A., Pesce, A.J., the C.V. Mosby Company, U.S.A. p: 1195-1207. 1989.
17. Karcher, R.E., Nuttall, K.L.: Lipoprotein Agarose Gel Electrophoresis. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, eds. Burtis, C.A., Ashwood, E.R., W.B. Saunders Company, Pennsylvania, p: 154-155. 1999.
18. Warnick, G.R., Benderson, J.M., Albers, J.J.: Dextran Sulfate-Mg²⁺ Precipitation Procedure for Quantitation of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *Clin. Chem.* 1982; 28 (6): 1379-1388.
19. Herdt, T.H., Liesman, J.S., Gerloff, B.J., Emery, R.S.: Reduction of Serum Triacylglycerol-Rich Lipoprotein Concentration in Cows with Hepatic Lipidosis. *Am. J. Vet. Res.* 1983; 44 (2): 293-296.
20. Özpınar, H., Schweigert, F.J., Özpınar, A., Wierich, M., Senel, H.S.: Änderung der Verteilung der Fettlöslichen Vitamine auf die Lipoproteinfraktionen bei Saugkälbern und Kühen in Abhängigkeit von der Geburt. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 1988; 101: 383-387.
21. Sakagami, T., Zilversmit, D.B.: Separation of Dog Serum Lipoproteins by Ultracentrifugation, Dextran Sulfate Precipitation, and Paper Electrophoresis. *J. Lipid Res.* 1961; 2 (3): 271-277.
22. Watson, P., Simpson, K.W., Bedford, P.G.C.: Hypercholesterolemia in Briards in United Kingdom. *Res. Vet. Sci.* 1993; 54: 80-85.
23. Sjoblom, L., Eklund, A.: Determination of HDL2 Cholesterol by Precipitation with Dextran Sulfate and Magnesium Chloride: Establishing Optimal Condition for Rat Plasma. *Lipids.* 1989; 24 (6): 532-534.
24. Assmann, G., Schriewer, H., Schmitz, G., Hagele, E.O.: Quantification of High Density Lipoprotein Cholesterol by Precipitation with Phosphotungstic Acid/MgCl₂. *Clin. Chem.* 1983; 29: 2026-2030.
25. Downs, L.G., Bolton, C.H., Crispin, S.M., Wills, J.M.: Plasma Lipoprotein Lipids in Five Different Breeds of Dogs. *Res. Vet. Sci.* 1993; 54: 63-67.
26. Downs, L.G., Zani, V., Wills, J.M., Crispin, S.M., Bolton, C.H.: Changes in Plasma Lipoprotein During the Oestrus Cycle of Bitch. *Res. Vet. Sci.* 1994; 56: 82-88.

27. Crispin, S.M., Bolton, C.H., Downs, L.G.: Plasma Lipid and Lipoprotein Profile of Working and Pet Border Collies. *Vet. Rec.* 1992; 130: 185-186.
28. Dimski, D.S., Buffington, C.A., Johnson, S.E., Sherding, R.G., Rosol, T.J.: Serum Lipoprotein Concentrations and Hepatic Lesions in Obese Cats Undergoing Weight Loss. *Am. J. Res.* 1992; 53 (7): 1259-1262.
29. Knipping, G.M., Kostner, G.M., Holasek, A.: Studies on the Composition of Pig Serum Lipoproteins. Isolation and Characterization of Different Apolipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1975; 393 (1): 88-99.
30. Leat, W.M.F., Northrop, C.A.: Plasma Lipids and Lipoproteins of Some Herbivorous Mammals. *Proc. Nutr. Soc.* 1975; 34: 105A-107A.
31. Burstein, M., Scholnick, H.R.: Lipoprotein-Polyanion-Metal Interactions. *Adv. Lipid. Res.* 1973; 11 (67): 67-108.
32. Güldür, T., İleri, T.: İnsan ve Keçi Serumundaki Lipoproteinlerin Fosfotungstik Asit/MgCl₂ Presipitasyon Metodu ile Seperasyonunun Karşılaştırılması. *F.Ü. Sağlık Bil. Derg.* 1996; 10 (2): 175-182.