

İNSAN NÖTROFİL GRANÜLOSİTLERİNDEN ÇÖZÜNEBİLİR NADH OKSİDAZ ENZİMİ'NİN SAFLAŞTIRILMASI

Dr. Mustafa ÜNALDI*, Dr. İdris AKKUŞ*, Dr. Mehmet AKÖZ*, Dr. Mehmet GÜRBİLEK*,

Bil. Uzm. Mustafa YÖNTEM**, Dr. Ahmet ÇIĞLI*

* S.Ü. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı

** S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Öğrencisi

ÖZET

Bu çalışmada, nötrofil lökositlerin H₂O₂'nin oluşturulmasında görevli NADH oksidaz enzimi, insan venöz kanından elde edilen nötrofil lökositlerden saflaştırılmıştır.

Saflaştırmada Badwey ve Karnovsky'in kullandıkları basamaklara DEAE Sefadex A-50 kromatografisi eklenmiştir.

Saflaştırma sonunda dakikada miligram protein başına 892 nmol özgül aktivite ile 123.89 saflaştırma katsayısı elde edildi. Saflaştırılmış enzim poliakrilamid jel elektroforezinde ve izoenzim elektroforezinde tek band vermiştir.

Anahtar Kelimeler: Nötrofil granülositler, NADH oksidaz

SUMMARY

Purification of Soluble NADH Oxidase from Human Neutrophilic Granulocytes

In this study NADH oxidase enzyme, which has function in the production of H₂O₂ was purified from human neutrophyl leucocytes.

Badwey and Karnovsky's methods were used for purification with on addition of DEAE sephadex A-50 chromatography technique.

At the end of purification specific activity and purification coefficient were found as 892 nmol/mg protein and 123.89 respectively. The enzyme was found to have only one band at the end of polyacrylamid gel electrophoresis.

Key Words: Neutrophyl granulocytes, NADH oxidase

GİRİŞ

NADH oksidaz enzimi, oksijen ve NADH'dan H₂O₂ oluşumunu katalize eden bir flavoproteindir (1-8).

İnsan ve kobay lökositlerinin alkalin potasyum klorür homojenatlarının süpernatant fraksiyonları, siyanide duyarlı NADH oksidaz aktivitesine sahiptirler (2-4,9). Alkalin potasyum klorürde tamamen çözünebilir (4,9) olan bu enzim, 0.34 M sükröz ile homojenize edildiğinde yarısı granüler fazda kalmaktadır (9).

Lökositlerdeki H₂O₂ NADH oksidaz enzimi tarafından üretilir (2,3,6,9,10). Böylece mik-

roorganizmalar öldürülür. Enzimin eksikliğinde bu fonksiyon yerine getirilemez, ancak bazı mikroorganizmaların kendileri H₂O₂ kaynağıdır. Bu tip mikroorganizmaların öldürülmesinde NADH oksidaz eksikliği hissedilmez (3).

NADH oksidaz enzimi hakkındaki çalışmalar, 1957'de kronik granülomatoz hastalığının tanımlanmasından sonra, bu hastalıkla NADH oksidaz enzimi eksikliği arasında bir ilişkinin olduğunu düşünülmesi ile başlamış, daha sonra çok sayıda araştırmacı bu enzimin aktivitesi ve özellikleri üzerinde birçok çalışmalar yapmışlardır. 1964'te Cagan ve Karnovsky (11) kobay lökositlerinden enzimi üç kademelik bir saflaştırmaya tabi tutmuşlardır. Ayrıca

Haberleşme Adresi: Doç. Dr. İdris AKKUŞ, S.Ü.T.F. Biyokimya Anabilim Dalı, KONYA

Badwey ve Karnovsky'de 1979'da kobay lökositlerinden enzimi saflaştırmışlardır (2).

Ülkemizde bu enzimle ilgili herhangi bir araştırmaya rastlayamadık. 1979 yılında yapılan bir çalışmada Tanzer (12) malnütrisyonlu çocuklarda enzim aktivitesini tayin etmiş ve normaller ile karşılaştırmıştır.

Enzimin solunumsal patlama (Respiratory burst) daki büyük önemine rağmen yeterli miktarda lökosit teminindeki güçlük sebebi ile tam bir saflaştırılması ve kinetik özellikleri hakkında yeterince inceleme yapılamamıştır (2,4). Kobay ve insan NADH oksidazına ait Km değerlerinin farklı olarak bildirilmesi enzimin substratı hakkındaki tartışmaların sürmesi, çözümü gereken problemler olarak görülmektedir. Bu problemlerin çözümü ve birçok kinetik parametrelerin belirlenmesi total bir pürifikasyonu gerektirir.

Yukarıda sayılan problemlerin çözümüne katkıda bulunabilmek ve bundan sonra yapılacak araştırmalara yardımcı olmak üzere, gönüllü şahıslardan alınan kandan elde edilen lökositlerden NADH oksidaz enziminin, lökosit homojenatından sonra dört kademelik bir işlemle saflaştırılması, numune ile enzimin bazı özelliklerinin tesbiti ve şimdiye kadar yapılmış olanlarla birlikte değerlendirilmesi düşünülmüştür.

MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup aşağıdaki firmalardan temin edildi;

Dimetil sülfoksit, Dimetil asetik asit, Kiesegel G, etil, asetat, potasyum siyanür, metanol, piridin, üreaz, sodyum tungstat ve lityum sülfat, merck' (B. Almanya) den;

Dansil klorid, sodyum azid, NADPH, NADH, NAD, NADP, ADP, ATP, FAD, sefadeks G-200-120, Blue dekstran, glukoz oksidaz, TEMED, DEAE Sefadeks A-50, cyanogum - 41, ε - amino kaproik asit, Coomassie brilliant blue, amonyum persülfat, MTT tetrazolium ve Dansilli amino asit standartları Sigma (ABD)'den;

TRIS, ovalbumin, toluen, sodyum dezoksikolat, Na₂ EDTA, borik asit ve magnezyum klorür Fisher (ABD)'den;

Östradiol, androsteron ve hidrokortizon asetat, K

and K lab. Inc (ABD)'den;

Dezoksikolik asit, dezoksikortikosteron asetat, ürikaz, ve horseradiche peroksidaz NBC (ABD)'den;

Ficol-Paque Pharmacia (İsveç)'den;

Silikon (Siliclad) Clay adams (ABD)'den;

2- Merkapto etanol ve guanidin hidroklorür Eastman (ABD)'den;

Perklorik asit Riedal (B. Almanya)'den;

Diğer bir kısım kimyasal maddeler yerli firmalardan sağlanmıştır.

LÖKOSİTLERİN AYRILMASI ve HOMOJENİZASYON

Bu işlemler çeşitli araştırmacıların metodlarından (9,12-22) yararlanarak aşağıdaki şekilde yapıldı;

Bütün işlemlerde, homojenizasyon işleminin sonuna kadar ya plastik veya silikonlanmış cam malzeme kullanıldı. İçinde 75 ml ACD (Asit-sitrat-Dekstroz) solüsyonu bulunan kan torbalarına 325 ml kan alındı. 200 ml makrodex ilave edildi (12,23,24). 30'ar ml'lik tüplere dağıtılarak oda ısısında (17) bir saat bekledikten sonra plazmalar alınarak biraraya toplandı. Kolon kromatografileri hariç bundan sonraki işlemler 2-5 °C'de yapıldı (20). Plazmalar 250 g'de 10 dakika (9-12) santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Dipte kalan lökosit palleti Hanks solüsyonu ile iki defa yıkandıktan sonra (16, 17, 25) eritrositler hipnotik şok ile parçalandı (17, 21,26). Lökosit palleti soğuk Hanks solüsyonu ile iki kez daha yıkandıktan sonra aynı solüsyonla süspansiyon haline getirildi. Sayım ve nötrofil yüzdesi için yayma yapıldı. 4 kısım süspansiyon 3 kısım ficoll Paque üzerine tabakalandırıldıktan sonra (16), 400 g'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Dipte kalan faz nötrofilce zengin fazdır. Bu faz Hanks solüsyonu ile bir kez ve homojenat ortamı ile iki kez yıkandıktan sonra homojenat ortamı ile yeniden süspansiyon edildi. Sayım ve yayma yapıldı.

Homojenat ortamı olarak 0.32x10⁻⁴ M KHCO₃ ve 154 mM KCl içeren solüsyon kullanıldı.

Nötrofiller potter tip homojenizatör • ile homojenize edildikten sonra 250 g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant alındı.

ENZİMİN SAFLAŞTIRILMASI

1) Granüler ve solübl fazların ayrılması:

Yukarıda elde edilen süpernatant 30000 g'de 20 dakika santrifüj edilerek (2,9) granüler faz çöktürüldü (27). Süpernatant alındı. Protein ve aktivite tayinleri yapıldı. Poliakrilamid jel elektroforezi uygulandı.

2) Amonyum sülfat ile çöktürme:

Amonyum sülfat çöktürmesi Badwey ve Karnovsky (2)'nin kullandıkları metoda göre yapıldı. 12000 g'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra (28) NADH oksidaz bulunan süpernatant alındı. NADH oksidaz süpernatandan tuz çöktürmesi ile çöktürülerek alındıktan sonra çökelek TRIS tamponunda çözüldü.

3) Dializ:

Tuz çöktürmesi sonucu elde edilen numune, pH'sı 7 olan 5 mM TRIS-HCl tamponuna karşı se-lofen membran ile bir gece boyunca dializ edildi.

4) Sefadex G-200 gel elemesi:

Sefadex G-200 - 120 jel boncukları oda sıcaklığında 3 gün pH'sı 7.5 olan TRIS-HCl tamponu ile dengelendikten sonra 4 x 50 cm'lik paket olacak şekilde kolona dolduruldu. Dializlenmiş numune evaporatörle yarı hacmine kadar konsantre edildi ve her 6 ml'si bir defada olmak üzere bu kolona uygulandı. Kolon aynı tamponla doldurulmuş rezervuara bağlandı. 35-40 cm sıvı basıncı ile kromatografiye devam edildi. Fraksiyon toplayıcısının damla sayıcı ünitesi ile 75 damlalık fraksiyonlar toplandı.

Fraksiyonlar 280 nm dalga boyu taramasına tabi tutularak protein pikleri belirlendi ve enzim aktivitesi tayin edildi (29).

Aktivite gösteren numuneler birleştirildi. En yüksek aktiviteli fraksiyondan elektroforez yapıldı.

5) DEAE sefadex kolon kromatografisi:

Jel elemesinden elde edilen aktivite taşıyan fraksiyonlar bir gece 5 mM pH 7 TRIS - HCl tamponu ile dializden sonra evaporatörle hacmi azaltılarak 2.5 x 25 cm boyutlarındaki DEAE sefadex (11) kolonuna tatbik edildi. Kolan daha önceden pH'sı 7 olan 50 mM TRIS -HCl tamponu ile dengelendi. Aynı tamponla kromatografiye devam edildi. Daha sonra aynı tamponla bu tamponun 500 mM NaCl içeren ikinci bir kısmı arasında tuz gradiyenti uy-

gulayarak yıkamaya devam edildi. Akış hızı 25 ml/saat olarak ayarlandı. 100 damlalık fraksiyonlar ayrı ayrı toplandı. Protein miktarı ve enzim aktivitesi tayin edildi. aktiviteli fraksiyonlar toplandı. Bir gece dializ edildi. Enzim özelliklerinin araştırılacağı deneylerde kullanılmak üzere konsantre edilerek buzdolabında saklandı. En yüksek aktiviteli fraksiyondan elektroforez yapıldı.

6) Protein tayini:

Kromatografik çalışmalarda kolan fraksiyonlarının 280 nm dalga boyundaki absorbansı okundu. Kantitatif tayin için modifiye Lowry metodu kullanıldı (30-32).

7) Aktivite ölçümü:

Aktivite ölçümü Iverson ve arkadaşlarının (29) bildirdikleri Lowry ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı.

Prencip : Piridin nükleotidlerinin asit ortamda redukte formunun bazik ortamda ise okside formunun bozulması ve oluşan bozulma ürünlerinin ultraviyole ışık ile uyarıldığında floresans emisyonu yapmaları ve bu floresansın ölçülmesi ile madde miktarının belirlenmesi esasına dayanır.

1.25 mM NADH ve 2.50 mM KCN içeren substrat çözeltisinden 0.8 ml inkübasyon tüpüne konuldu. Tüpün üzerine 0.2 ml numune konulup 60 dakika 37 °C'de çalkanarak su banyosunda inkübe edildi. Inkübasyon sırasında 0.4 N HClO₄ ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve 3000 devirde 10 dakika santrifüje edilerek proteinler çöktürüldü.

Santrifügasyondan sonra süpernatandan 0.2 ml, ikinci bir deney tüpüne alındı ve üzerine 0.3 ml 10 N NaOH ilave edilerek 60 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra her bir örneğe 3.2 ml redistile su ilave edildi ve florometrik ekler monte edilmiş Beckman DU-2 spektrofotometre ile 365 nm eksitasyon ve 448 nm emisyonunda okundu. Sonuçlar NAD ile hazırlanmış standart grafiğinde nM NAD olarak değerlendirildi. Emisyon ışığı rölatif olarak değerlendirildi. Bütün standart ve numunelerden kör değerler çıkarıldı.

Sonuçlar spesifik aktivite için dakikada mg protein başına n mol (NAD) olarak değerlendirildi (20).

8) Poliakrilamid jel elektroforezi : PAJE:

Saflaştırmanın her basamağında saflaştırma dereces PAJE ile kontrol edildi. Jel olarak % 5 NN' metilenbis akrilamit ve %95 akrilamit içeren Cyanagum 41 (33,34), katalizör olarak amonyum persülfat, TEMED karışımı (33,36), tampon olarak da pH'sı 8.4 olan TRIS-Borik asit EDTA Disodyum (37) kullanıldı. Boyamada coomasie birillant blue kullanıldı. Numune 90x6 mm boyutlarındaki jel kolonlarına tatbik edildi. Kolon başına 4 mA akımla öncül boya bitiş ucuna 5 mm yaklaşınca kadar elektroforeze tabi tutuldu.

BULGULAR

Enzim saflaştırılması ile ilgili bulgular Tablo 1'de toplu olarak gösterilmiştir.

Enzim saflaştırma işlemleri sonunda 160 ml homojenattan % 31.18 verimle dakikada mg protein başına 892 nmol'lük bir özgül aktiviteye ulaşılmış ve saflaştırma katsayısı 123.89 olarak bulunmuştur.

Homojenattaki total protein 1430 mg, total aktivite 10.296 nmol, özgül aktivite ise dakikada mg protein başına 7.2 nmol iken 30000 g'de santrifüje etmeden sonra alınan süpernatant kısmında total pro-

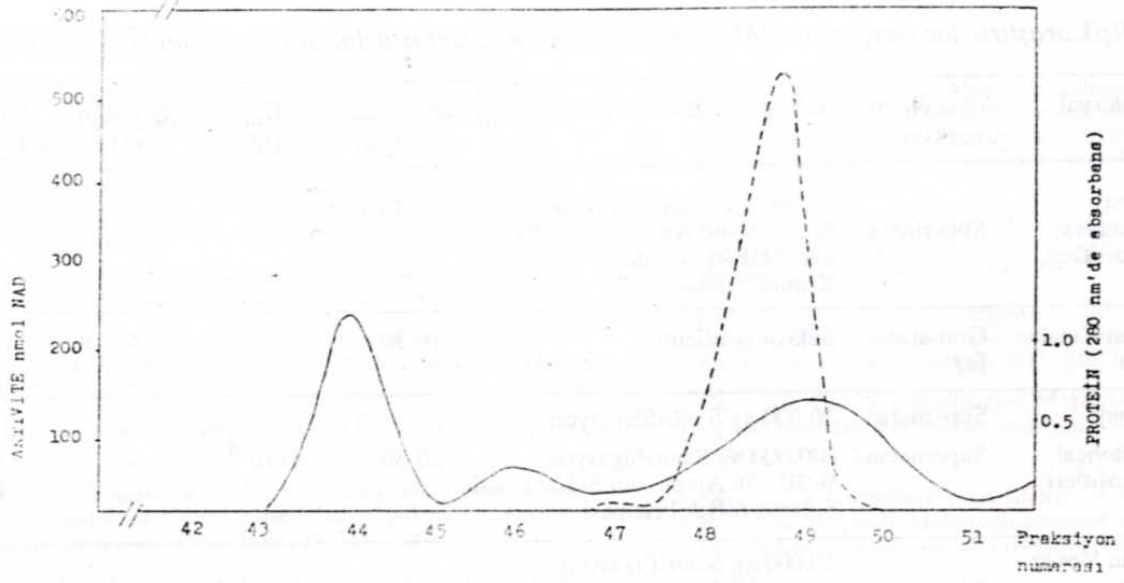
tein 760 mg, total aktivite 9424 nmol ve özgül aktivite ise dakikada mg protein başına 12.4 nmol'e yükselmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesinde % 30 - % 56 kesimi alınmış ve bu basamakta total protein 159 mg, total aktivite 7791 nmol ve özgül aktivite ise dakikada mg protein başına 49 nmol olarak tesbit edilmiştir.

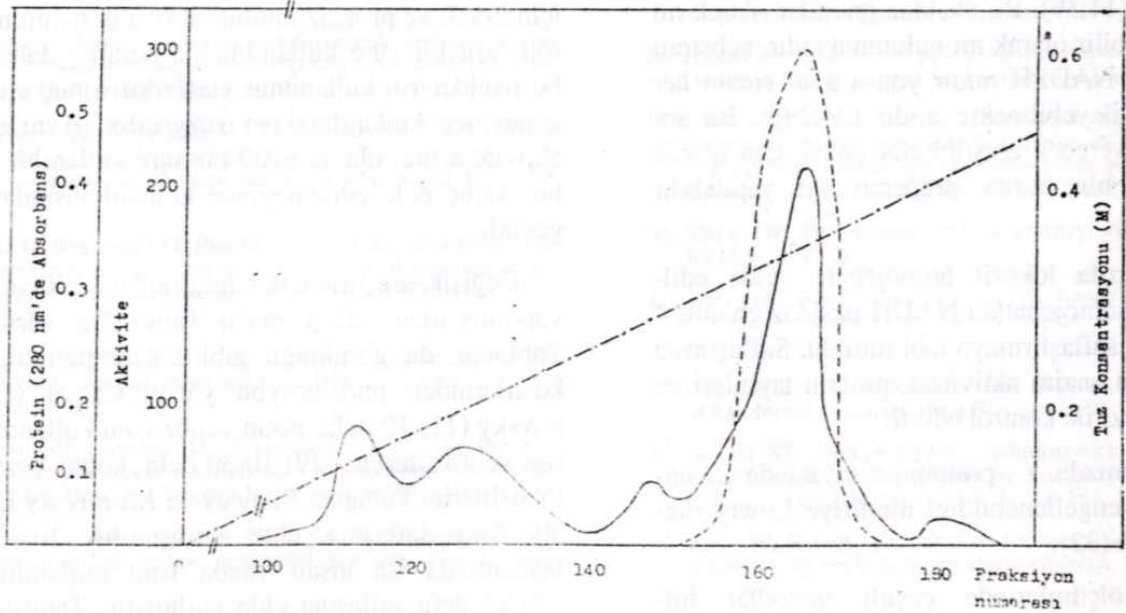
Sefadeks G-200 jel elemesi sonunda yapılan protein ve aktivite taramasında 188 ml'den itibaren enzim çıkmış, toplanan aktiviteli fraksiyonların hacmi 108 ml olarak bulunmuştur. Yapılan ölçümlerde total protein 12 mg, total aktivite 5232 nmol, özgül aktivite ise dakikada mg protein başına 436 nmol olarak bulunmuştur. Bu kademeye ait elüsyon grafiği Şekil - 1'de verilmiştir. DEAE sefadeks A-50 kolonunda yapılan saflaştırmada protein ve aktivite taramalarından elde edilen değerlerle çizilen grafik Şekil - 2'de gösterilmiştir. Bu kademede total protein 36 mg, total aktivite 3211 nmol ve özgül aktivite ise dakikada mg protein başına 892 nmol olarak elde edilmiştir.

Tablo 1. Nötrofil granülosit homojenizatından çözünebilir NADH oksidaz enziminin saflaştırılmasına ait basamaklar ve elde edilen sonuçlar

Basamak numarası	Basamak	Hacim (ml)	P R O T E İ N		N A D H O K S İ D A Z			Saflaştırma katsayısı
			Total protein miktarı (mg)	% Verim	Özgül aktivite mg protein başına nmol/Dk.	Total aktivite (nmol)	% Verim	
	Lökosit Suspansiyonu	130	-	-	-	-	-	-
	Homojenat	160	1430	100	7.2	10296	100	1
2.4.1	30.000 g Santrifüjasyon Süpernatanı	145	760	53.15	12.4	9424	91.53	1.72
2.4.2	Amonyum Sulfat Çöktürmesi % 30 - % 56 Doygunluk Kesiti	80	159	11.12	49	7791	75.67	6.81
2.4.3	Sefadeks G-200 Jel Elemesi	108	12	0.84	436	52.32	50.82	60.56
2.4.4	DAEA Sefadeks A-50 Kromatografisi	72	3.6	0.25	892	3211	31.18	123.89



Şekil 1. Sefadex G-200-120 jel eleme elüsyon grafiği (fraksiyon 40 damla)
————— protein - - - - - aktivite



Şekil 2. DEAE Sefadex A-50-120 Kolon Kromatografisi (Fraksiyon 40 damla)
————— protein - - - - - Aktivite - . - . - Tuz gradienti

Tablo 2. Değişik araştırmacılar tarafından NADH oksidaz enziminin saflaştırılması ve bulunan bazı özellikleri

Araştırmacı	Materyal	Alınan homojenat fazı	Saflaştırma Basamakları	Saflaştırma katsayısı	K _m (M)	Optimum pH	Molekül Ağırlığı
Cagan ve Karnovsky (11)	Kobay Peritoneal Lökositleri	Süpernatant	30.000 x g santrifügasyon % 30 - % 60 Amonyum Sulfat kesiti DEAE Selüloz Kromatografisi	10	1x10 ⁻³	5	-
Iverson ve ark. (29)	İnsan Venöz kanı	Granüler faz	Sükroz gradienti	10-30	-	6	-
Badwey ve Karnovsky (2)	Kobay Peritoneal Lökositleri	Süpernatant	30.000 xg Santrifügasyon 100.000 xg Santrifügasyon % 30 - 56 Amonyum Sulfat kesiti Sefaroz 6-B Jel elemesi	20-50	4x10 ⁻⁴	-	310 bin ± 14 bin
Çalışmamız	İnsan Venöz kanı	Süpernatant	30.000 xg Santrifügasyon % 30 - 50 Amonyum sulfat kesiti Sefadex G-200-120 Jel elemesi DEAE Sefadex A-50 Kromatografisi	123.89	4.8x10 ⁻⁴	7	280 bin

TARTIŞMA

Fagositozda önemli bir yeri olan H₂O₂ üretiminde pridin nükleotidlerine bağlı bir oksidazın sorumlu olduğu yaygın bir kanıdır (2,3,29,38). Fakat bunun substratı ve hücre içindeki lokalizasyonu tartışılmaktadır (11,39). Bu oksidaz granüler olarak mı yoksa çözünebilir olarak mı bulunmaktadır, substratı NADH midir NADPH midir yoksa aynı enzim her ikisini de etkileyebilmekte midir (24,29)? Bu sorulara cevap verecek araştırmalar ancak tam olarak saflaştırılmış bir enzim preparatı ile yapılabilir (2,29).

Çalışmamızda lökosit homojenatı elde edildikten sonra homojenattan NADH oksidaz enzimi 4 basamaklı bir saflaştırmaya tabi tutuldu. Saflaştırma her basamakta enzim aktivitesi, protein tayinleri ve jel elektroforezi ile kontrol edildi.

Araştırmamızda, protein tayininde enterferansların engellenebildiği modifiye Lowry metodu kullanıldı (32).

Aktivite ölçümlerinde çeşitli metodlar bildirilmekle beraber (2,29,40) içlerinde en duyarlı ve kolayca uygulanabilir olan Iverson ve arkadaşlarının (29) florometrik metodları uygulandı.

Çalışmalarımız pH 7'de yapıldı. NADH konsantrasyonu ise 1 mM olacak şekilde inkübasyon ka-

rışımı hazırlandı. Tampon olarak Gomori' (41) nin verdiği tampon listesinden faydalanarak stossel ve arkadaşları (42)'nin kullandığı Tris-HCl tamponu kullanıldı.

Enzim çalışmalarında -SH gruplarını korumak için 2-ME ve proteaz inhibitörü olarak ε-amino kaproik asit bir süre kullanılmakla beraber daha sonra bu maddelerin kullanılmasıyla farklı sonuç elde edilemeyince kullanılmaktan vazgeçildi. Aynı şekilde aktivite artırıcı olarak FAD bir süre kullanıldı. Farklı bir sonuç elde edilemeyince kullanılmasından vazgeçildi.

Değişik araştırmacılar tarafından şimdiye kadar yapılmış olan saflaştırmalar Tablo 2'de verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi kobay peritoneal lökositlerinden purifikasyon yapan Cagan ve Karnovsky (11) 10 defa, insan venöz kanı kullanan Iverson ve arkadaşları (29) 10-30 defa, kobay peritoneal lökositlerini kullanan Badwey ve Karnovsky (2) 20 - 50 defa saflaşma elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise insan venöz kanı kullanılmış ve 123.89 defa saflaşma elde edilmiştir. Tarafımızdan elde edilen bu yüksek rakamın nedeni saflaştırmanın bir basamak daha ileri götürülmüş olmasına bağlanabilir. Ayrıca sefadex G-200 - 120 jel elemesi tarafımızdan yapılan değişik bir uygulamadır. Farklılık bundan da ileri gelebilir.

KAYNAKLAR

1. Torunoğlu M. "Kan hastalıkları fizyopatolojisi". dolaşım, solunum ve kan hastalıkları fizyopatolojisi Ankara: Ankara Ü. Tıp Fak., 1981: 325.
2. Badwey JA, Kamovsky ML. Production of superoxide and hydrogen peroxide by an NADH oxidase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem 1979; 254: 11530.
3. Klebanoff SJ, antimicrobial mechanism in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. Semin Hematol 1975; 12: 117.
4. Baehner RL, Kamovsky ML. Deficiency of reduced Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Oxidase in chronic granulomatous disease. Science 1968; 162: 1278.
5. Yenson M. İnsan biyokimyası İstanbul Ün. Tıp Fak. 1981: 41-8.
6. Briggs RT, Kamovsky ML, Kamovsky MJ. Cytochemical demonstration of hydrogen peroxide in polymorphonuclear leucocytes phagosomes J Cell Biol 1975; 64: 254.
7. Yüregir GT. Temel biyokimya Adana: Çukurova Ü. Tıp Fak, 1981: 66.
8. Tekman Ş, Öner N. Genel biyokimya dersleri. İstanbul: İst. Ü. Ecz Fak, 1981: 355.
9. Baehner RL, Gilman N, Kamovsky ML. Respiration and glucose oxidation in human and guinea pig leukocytes comparative studies. J Clin Invest 1970; 49: 692.
10. Winkelstein JA, Drachman RH. Phagocytosis, the normal process and its clinically significant abnormalities. Pediatr Clin North Am 1974; 21: 551.
11. Cagan RH, Kamovsky ML. Enzymatic basis of the respiratory stimulation during phagocytosis, Nature 1964; 204: 255.
12. Tanzer F. Protein enerji malnütrisyonda enfeksiyonların esas elementler ve enzimlerle ilişkileri. Doçentlik tezi, Hacettepe Ün Tıp Fak, Ankara, 1979.
13. Goldstein IM, Cerquesra M, Lind S, Kaplan HB. Evidence that the superoxide-generating system of human leukocytes is associated with the cell surface. J Clin Invest 1977; 59: 249.
14. Bretz U, Baggiolini M. Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. J Cell Biol 1974; 63: 251.
15. Henson PM, Oades ZG. Stimulation of human neutrophils by soluble and insoluble immunoglobulin aggregates. J Clin Invest 1975; 56: 1053.
16. West My, Sinclair D, Soutwell-Keely P. On the stoichiometry of oxygen metabolism in polymorphonuclear leukocytes. Biochem Biophys Res Commun 1981; 100-212.
17. West BC, Rosenthal AS, Gelb NA. Separation and characterization of human neutrophil granules. Am J Pathol 1974; 77: 41.
18. Markert M, Allaz MJ, Frei J. Continuous monitoring of oxygen consumption and superoxide production by particle-stimulated human polymorphonuclear leukocytes. Febs Lett 1980; 113: 225.
19. Johnston RB, Keele JBB, Mira JHP, Lehmeier JE, Webb LS, Baehner RL, Rajagopalan KV. The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity, studies with normal and chronic granulomatous disease leukocytes. J Clin Invest 1975; 55: 1557.
20. Stossel TP, Pollard TD, Mason RJ, Vaughan M. Isolation and properties of phagocytic vesicles from polymorphonuclear leukocytes. J Clin Invest 1971; 50: 1745.
21. De Chatelet LR, Shirley PS. Pyridine nucleotide dependent generation of hydrogen peroxide by a particulate fraction from human neutrophils. J Immunol 1981; 126: 1165.
22. Green TR, Pratt KL. Purification of the solubilized NADPH: O₂ oxidoreductase of human neutrophils. J Biol Chem 1988; 263 (12): 5617-23.
23. Simchowicz L, Spilberg I. Generation of superoxide radicals by human peripheral neutrophils activated by chemotactic factor, evidence for the role of calcium. J Lab Clin Med 1979; 93: 583.
24. Cohen HJ, Newburger PE, Chovaniec ME. NAD (P) H dependent superoxide production by phagocytic vesicles from guinea pig and human granulocytes. J Biol Chem 1980; 255: 6584.
25. Heyneman RA, Bauwens-monbalu D. kinetics of Nicotinamide Adenine Dinucleotides in oleate-stimulated polymorphonuclear leukocytes. Febs Lett 1981; 127: 87.
26. Ögüş A, Tezcan EF. Purification subunit structure of glutathione reductase from human leukocytes. Biochem Med 1981; 25: 81.
27. Mc Phail LC, De Chatelet LR, Shirley PS. Further characterization of NADPH oxidase activity of human polymorphonuclear leukocytes J Clin Invest 1976; 58: 774.
28. Tezcan EF. İnsan serum psödokalinesterazının alt birim yapısı, Doçentlik tezi, Hacettepe Ü. Tıp Fak. Ankara 1974.
29. Iverson D, De Chatelet LR, Spitznagel JK, Wang P. Comparison of NADH and NADPH oxidase activities in granules isolated from human polymorphonuclear leukocytes with a fluorometric assay. J Clin Invest 1977; 59: 282.
30. Suttie JW. Introduction to biochemistry. Holt Rinehart and Winston 1977: 68.
31. Lowry OR, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265.
32. Bensadoun A, Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. Anal Biochem 1976; 70: 241.
33. Soysal ST. Glukoz-6-Fosfat dehidrogenaz enziminin insan eritrositlerinden saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin araştırılması Doçentlik tezi Atatürk Ü. Tıp Fak. Erzurum 1980.
34. Zais DP, Roberts RC. System for simplified discontinuous-gradient polyacrylamide-gel electrophoresis. Clin Chem 1977; 29: 590.
35. Özer N. Sıçan karaciğeri oligomisine duyarlı adozin trifosfat enziminin saflaştırılması, alt birim yapısı ve kinetik özellikleri. Doçentlik tezi, Hacettepe Ü. Tıp Fak. Ankara 1979.

36. Asao T. Quantitative analysis of proteins by the use of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1977; 77: 321.
37. Brewer GJ, Sing CF. Specific electrophoretic systems Methods of biochemical analysis Volume: XVIII. London John Wiley and Sons, 1970.
38. Nathan DG, Baehner RL, Brown EB, Moore CV. Disorders of phagocytic cell function, *Progress in Hematology*. Volume: VII. London: Grune and Stratton, 1971.
39. Mandell GL, Sullivan GW. Pyridine nucleotide oxidation by intact human polymorphonuclear neutrophils. *Biochem Biophys Acta* 1971; 234: 43.
40. De Chatelet LR, Mc Phail LC, Mullikin D, Mc Call CA. An isotopic assay for NADPH oxidase activity and some characteristics of the enzyme from human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1975; 55: 714.
41. Gomori G, Colowick SP, Kaplan NO. Preparation of buffers for use in enzyme studies, methods in Enzymology. Volume: I. New York: Acad Pres 1955: 138.
42. Stossel TP, Masson RJ, Pollard TD, Vaughan M. Isolation and properties of phagocytic vesicles. II. Alveolar macrophages. *J Clin Invest* 1972; 51: 604.