

## فعالية انزيم السوبر اوكسايد دزميوتيز وعلاقته ببعض العناصر النزرة في بلازما مرضى فقر الدم المنجلي.

عبدالكريم جاسم هاشم ، رافد محمد كريم ، داود سلمان علي\*

قسم التقنية الاحيائية- كلية العلوم - جامعة بغداد. العراق، بغداد.

\* قسم علوم الحياة- كلية العلوم- جامعة البصرة. العراق، البصرة.

### الملخص

اعتمدت الدراسة على عزل وتنقية وتقدير فعالية إنزيم Superoxide dismutase (SOD) في الأشخاص المصابين بفقر الدم المنجلي من نوع Hb<sub>S</sub>/F والنوع Hb<sub>S</sub>/S. وقد أظهرت النتائج انخفاضاً واضحاً في قيم الفعالية الكلية لإنزيم SOD في بلازما مرضى كلا النوعين من فقر الدم المنجلي عند قياسها مع الأشخاص الأصحاء (مجموعة السيطرة) ، كما كانت الفعالية الكلية للإنزيم أكثر انخفاضاً في النوع Hb<sub>S</sub>/S من النوع Hb<sub>S</sub>/F ، وتم اعتماد طريقة الريبوفلافين / نايترولوترازوليوم في تقدير الفعالية الكلية لإنزيم SOD . كما أظهرت النتائج انخفاضاً معنوياً في مستوى الزنك وارتفاعاً في مستوى النحاس في بلازما المرضى لكلا النوعين مقارنة بالسيطرة.

نُقي إنزيم SOD من مجموعتين : الأولى هي مجموعة السيطرة وتتضمن بلازما الاشخاص الأصحاء ، والأخرى هي مجموعة المرضى واشتملت خطوات التنقية استخدام بعض المذيبات والترسيب بواسطة الأسيون ومن ثم الترشيح الهلامي في عمود السيفادكس 100 - G ، وبلغ عدد مرات التنقية 7.33 بحصيلة مقدارها 72.34% بالنسبة للإنزيم المُنقى من المجموعة الأولى بينما كانت عدد مرات التنقية 7.03 بحصيلة مقدارها 64.81 % بالنسبة للإنزيم المُنقى من المجموعة الأخرى.

### Activity of Superoxide Dismutase and its Relationship with Some Trace Elements in Plasma of Sickle Cell Anemia Patients

#### Abstract

The study was dealing with isolation , purification and evaluation activity of SuperOxide Dismutase ( SOD ) in patients with sickle cell anemia type Hb<sub>S</sub>/F and Hb<sub>S</sub>/S. The result was revealed a significant decreases in values of total SOD activity in plasma of patients with both type sickle cell anemia as compared with healthy individuals (control) , furthermore the total enzyme activity was more decreased in type Hb<sub>S</sub>/S than type Hb<sub>S</sub>/F. total SOD activity was determined by riboflavin / nitrobluetetrazolium assay. The result was also revealed a significant decrease in zinc level while the level of copper was increased in both patient plasma in comparison with control.

The purification procedure represented by using some solvents and precipitation by acetone then gel filtration on Sephadex – G100 column .The overall purification folds and the yield of the enzyme purified from control group were 7.33 and 72.34 % respectively while the from patients group were 7.03 and 64.81 % respectively .

## المقدمة

يُعد إنزيم السوبرأوكسايد ديزميويتيز SOD

(EC1.15.1.1) أحد أهم الإنزيمات المضادة للتأكسد antioxidant enzyme؛ إذ يُحفز على تحويل جذور السوبرأوكسايد ألسالبي ( $O_2^-$ ) إلى بيروكسيد الهيدروجين وماء، وتنتج جذور السوبرأوكسايد في جميع الخلايا المستهلكة للأوكسجين خلال عملياتها الأيضية، وتتميز هذه الجذور بتأثيرها المدمر للخلايا ويقدرتها على تحفيز سلسلة من التفاعلات المولدة لأنواع الأوكسجين المتفاعل (ROS) ومن ثم زيادة تلف الخلايا؛ لذا فإن وظيفة SOD تكمن في حماية الخلايا من الأخطار الناجمة عن جذور السوبرأوكسايد (1, 2). برزت أهمية الإنزيم من إمكانية استخدامه دواءً لعلاج العديد من الحالات الفسلجية والمرضية التي تحدث بفعل أنواع الأوكسجين المتفاعل مثل: التهاب المفاصل الرثوي، والتهاب المثانة، و التكتسات العصبية، كما يُستخدم الإنزيم في معالجة أمراض الجهاز المناعي مثل: الإيدز وداء الذئبة الاحمراري (3)، فضلاً عن ذلك يمتلك الإنزيم أهمية كبيرة في مجالات الأبحاث العلمية والطبية نظراً لعلاقته بالعديد من الأمراض السريرية والوراثية ومن هذه الأمراض فقر الدم المنجلي والذي ينتج منه خلايا دم حمراء ذات أشكال منجلية تمتاز بسرعة تحللها مؤدية إلى حدوث الأنيميا أو فقر الدم، فضلاً عن ذلك فإن كريات الدم الحمراء المنجلية لها القابلية على أن تتجمع مع بعضها مسببة انسداداً في الشعيرات والأوعية الدموية وحرمان أنسجة الجسم المختلفة من الأوكسجين، ومن أهم أنواع فقر الدم المنجلي هي HbS/S، إذ يشكل الهيموغلوبين المنجلي 85% أو أكثر من الدم، و HbS/F، وفي هذا النوع يُشكل الهيموغلوبين المنجلي 70% من الدم أما النسبة المتبقية فيشغلها الهيموغلوبين-Fetal. وتتخذ كرية الدم الحمراء الشكل المنجلي بسبب احتوائها على هيموغلوبين غير طبيعي ينتج من طفرة نقطية يتم فيها استبدال الحامض الاميني كلوتاميك في الموقع رقم ( 6 ) من سلسلة بيتا لجزيئة الهيموغلوبين بالحامضالاميني alanine ( 4 ).

وبالنظر لأهمية إنزيم SOD وعلاقته بالعديد من الأمراض، ولقلة الدراسات المتعلقة بمرض فقر الدم المنجلي في العراق فقد هدف البحث إلى معرفة تأثير المرض في فعالية الإنزيم و بعض العناصر النزرة ( النحاس والزنك ) مقارنة مع نماذج السيطرة (الأصحاء).

## العينات

جُمعت 20 عينة دم من الأشخاص الأصحاء لكلا الجنسين، وتم اعتمادها على انها مجموعة سيطرة control، كما تم جمع 14 عينة دم من المرضى المصابين بفقر الدم المنجلي نوع Hbs /F، و 14 عينة دم للمرضى من نوع Hbs/s لكلا الجنسين وبأعمار تتراوح بين 10 - 40 سنة. أخذت عينة الدم بحجم 5 مللترات من المتطوع في انبوبة حاوية على مانع التخثر heparinized tube، ونبذت مركزياً بسرعة (3000 X g) لمدة 10 دقائق لفصل البلازما عن كريات الدم الحمراء وأهملت الاخير، وأستُخدم البلازما اليوم نفسه لغرض قياس الفعالية الانزيمية، بينما حُفظ البلازما المتبقي لكل عينة بالتجميد بدرجة حرارة (- 20 م ) لحين أستخدامة في التجارب اللاحقة المتعلقة بالانزيم.

## تعيين محتوى البروتين الكلي

تم حساب المحتوى الكلي للبروتين في عينة البلازما بطريقة Lowry ، وأستُخدم البومين مصل الابقار ( BSA ) بوصفه بروتين قياسي.

## تقدير فعالية أنزيم SOD:

تم تقدير فعالية الإنزيم بطريقة riboflavine/nitrobluetetrazolium التي وصفت بواسطة ( 5 ) وعلى وفق هذه الطريقة فإن الوحدة الواحدة one unit من SOD تُعرف على انها كمية العينة أو النموذج التي تُسبب نقصاناً في اختزال NBT بمقدار 50 %، وعلى هذا الاساس فإن فعالية أنزيم SOD في العينة أو النموذج يمكن التعبير عنها على النحو الآتي:-

$$\text{SOD activity (U/ml)} = \frac{\text{Sample inhibition\%}}{\text{Maximum inhibition\%}} \times \frac{2 \times 1000}{V_s(\mu L)}$$

إذ إن:

$$\text{Riboflavin/NBT assay unit} = \text{RU} \\ \text{Sample Volume} = V_s$$

## تقدير العناصر النزرة

تم تقدير تراكيز النحاس في العينات جميعها ( مجموعة السيطرة، ومجاميع المرضى ) باستخدام Copper Giesse Kit، كما قُدرت تراكيزالزنك باستخدام Zinc Giesse Kit

في الفعالية الإنزيمية؛ إذ كان ( $P \leq 0.01$ ) للفئة العمرية ( I ) و ( II ) . أما في البلازما للمرضى من نوع ( Hb<sub>S/S</sub> )، إذ يشكل الهيموغلوبين المنجلي نسبة 85 % أو أكثر من الدم، فقد أظهرت النتائج انخفاض الفعالية الإنزيمية بشكل ملحوظ إذ كانت ( $P \leq 0.01$ ) للفئة العمرية ( I ) و ( II ) قياساً مع السيطرة، كما أن قيم الانخفاض في الفعالية كانت أكبر في المرضى من نوع Hb<sub>S/S</sub> قياساً بالمرضى من النوع Hb<sub>S/F</sub> ( $P \leq 0.01$ ) ؛ ويعود سبب ذلك إلى نسبة الهيموغلوبين المنجلي التي تكون أعلى في المرضى من نوع Hb<sub>S/S</sub> وهذا يعني أن حالة الإقفار تكون أكثر تكراراً وأكثر حدة في المرضى من هذا النوع عن تلك التي يعاني منها المرضى من نوع Hb<sub>S/F</sub>؛ ونتيجة لذلك فإن  $H_2O_2$  و  $O_2^-$  الناتجة بسبب حالة الإقفار تكون بتركيز أعلى في بلازما المرضى من نوع Hb<sub>S/S</sub> عن أولئك المرضى من نوع Hb<sub>S/F</sub>، كل ذلك يجعل الفعالية الإنزيمية أكثر انخفاضاً في المرضى من نوع Hb<sub>S/S</sub> عن المرضى من نوع Hb<sub>S/F</sub> (1).

#### تقدير مستويات الزنك والنحاس في بلازما مرضى فقر الدم المنجلي:

أظهرت النتائج انخفاض في مستوى الزنك بشكل ملحوظ في بلازما المرضى من النوع Hb<sub>S/S</sub> ( $P \leq 0.01$ ) والنوع Hb<sub>S/F</sub> ( $P \leq 0.01$ ) قياساً مع الأشخاص الأصحاء، بينما ارتفع مستوى النحاس في بلازما المرضى من النوع Hb<sub>S/F</sub> ( $P \leq 0.01$ ) والنوع ( P ) Hb<sub>S/S</sub> ( $0.01 \leq$  قياساً مع الأشخاص الأصحاء وكما هو مبين في الجدول (2). كما بينت النتائج عدم وجود فروق معنوية في مستوى الزنك بين المرضى من النوع Hb<sub>S/F</sub> والمرضى من نوع Hb<sub>S/S</sub>، كما لم تظهر فروق معنوية في مستوى النحاس بين المرضى من كلا النوعين ( $P = 0.894$ ). ويُعزى انخفاض مستوى الزنك ( $P \leq 0.01$ ) إلى زيادة الإفراز البولي من الزنك (hyperzincuria) بسبب زيادة ترشح الزنك بواسطة الكبيبات الكلوية نتيجة لحالة التحلل الدموي المستمرة في مرضى فقر الدم المنجلي (8). إن انخفاض مستوى الزنك في مرضى فقر الدم المنجلي يؤدي إلى ارتفاع مستوى النحاس ويُعزى ذلك إلى العلاقة التضادية (antagonistic relationship) بين الزنك والنحاس، لقد أشارت الدراسات التي أُجريت لتفسير هذه العلاقة إلى أن

أُجريت طرائق العمل حسب تعليمات شركة Cervinaria المجهزة، وتم حساب تراكيز النحاس والزنك وفقاً للشركة اعتماداً على المعادلات ادناه:-

$$\text{Copper}(\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{E Sample}}{\text{ESTD}} \times 3.148$$

$$\text{Zinc}(\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{E Sample}}{\text{ESTD}} \times 30.60$$

إذ إن:

$$\text{Extinction} = \text{E} \\ \text{Standard} = \text{STD}$$

#### تنقية الأنزيم:

نُقي الأنزيم من بلازما مجموعة السيطرة ومن بلازما مجموعة المرضى (نوع Hb<sub>S/F</sub> + نوع Hb<sub>S/S</sub>) وبالاعتماد على طرائق التنقية التي وصفها (6) و (7)؛ إذ شملت خطوات التنقية استخدام بعض المذيبات (0.25ml من الكلوروفورم و 0.1 ml من الإيثانول)، والترسيب بوساطة 0.75ml من الأسيتون، ومن ثم الترشيح الهلامي خلال عمود Sephadex G-100 والاسترداد بداري فوسفات البوتاسيوم (0.2M, pH=7.8).

#### التحليل الأحصائي:

أخضعت النتائج للتحليل الأحصائي وباستخدام برنامج Minitab (version = 11)، وبمستوى معنوية ( $P \leq 0.01$ ).

#### النتائج والمناقشة

##### فعالية إنزيم SOD في بلازما المرضى و مجموعة السيطرة:

أظهرت النتائج المبينة في الجدول ( 1 ) أن الفعالية لإنزيم SOD ( RU/mL ) في بلازما الأشخاص الأصحاء الحاملين لخصاب الدم الطبيعي HbA تنخفض بزيادة العمر، إذ كانت الفعالية الإنزيمية للفئة العمرية ( I ) أعلى من الفعالية الإنزيمية للفئة العمرية ( II ) ( $P \leq 0.01$ ) وانخفضت فعالية الإنزيم في البلازما للمرضى من نوع Hb<sub>S/F</sub> إذ كانت ( $P \leq 0.01$ ) للفئة العمرية ( I ) و ( II ) قياساً مع السيطرة. كما أظهرت النتائج أنه كلما زادت النسبة المئوية لهيموغلوبين الدم المنجلي Hb<sub>S</sub> يرافقها نقصان

بلغت عدد مرات التنقية اثر هذه الخطوة 7.336 بحصيلة إنزيمية 72.34 % بالنسبة للإنزيم المنقى من المجموعة (I). ويوضح الشكل (1) الترشيح الهلامي لتنقية إنزيم SOD من المجموعة (I)، إذ يُلاحظ ظهور قمتين للبروتين وقمتين للفعالية الإنزيمية متطابقة تقريباً مع قمتي البروتين. لقد وقع الاختيار على القمة الأولى كي تُجرى عليها بقية التجارب المتعلقة بالإنزيم، في حين أهملت القمة الثانية، جاء اختيار القمة الأولى على أساس أن الفعالية الإنزيمية للقمة الأولى أكبر من الفعالية الإنزيمية للقمة الثانية، كما يُتوقع أن تمثل القمة الأولى المتناظر الإنزيمي EC-SOD لكون الوزن الجزيئي لأخيراً أكبر بكثير من الوزن الجزيئي لبقية المتناظرات الأخرى لإنزيم SOD، كما أنه يمثل الشكل السائد في بلازما الدم. من جانب آخر بلغ عدد مرات التنقية اثر الترشيح الهلامي لتنقية الإنزيم من المجموعة (II) 7.0315 بحصيلة إنزيمية 64.818، ويوضح الشكل (1) الترشيح الهلامي لتنقية إنزيم SOD من المجموعة (II)، إذ جاءت النتائج مشابهة لتنقية إنزيم SOD من المجموعة (I) وتم اختيار القمة الأولى للأسباب نفسها المذكورة أعلاه. جاءت نتيجة الترشيح الهلامي في الدراسة الحالية مشابهة إلى النتيجة التي توصل إليها (13) والذي استخدم الترشيح الهلامي لتنقية الإنزيم من قلب البقر.

الزنك يُحفز من تصنيع Metallothionein (MT) الذي يرتبط مع النحاس ويحتجزه داخل خلايا الأمعاء ويجعله غير قابل للامتصاص، وأن انخفاض مستوى الزنك يؤدي إلى نقصان في مستوى MT ومن ثم زيادة امتصاص النحاس (9، 10 و 11).

### تنقية إنزيم SOD:

اشتملت خطوات التنقية على معاملة عينة البلازما مع (Chloroform - Ethanol)، إذ يُهاجر الإنزيم إلى طور الايثانول ويعقب هذه المعاملة نبد مبرد للحصول على الراشح، بلغ عدد مرات التنقية في هذه الخطوة 1.69 بحصيلة إنزيمية 112.46 % بالنسبة لتنقية الإنزيم من المجموعة (I) بينما كانت عدد مرات التنقية 1.59 بحصيلة إنزيمية 78.10 % بالنسبة لتنقية الإنزيم من المجموعة (II) (الجدول 3). وعمل الطور الإنزيمي بعد ذلك مع فوسفات البوتاسيوم الصلب ( $K_2HPO_4$ )، إن الغرض من هذه المعاملة هو الترسيب الملحي لطور الايثانول، إذ ينفصل على شكل طبقة أو طور إلى الأعلى Ethanol - rich upper phase، وجمع الطور العلوي وتُبذ بالنابذ المُبرد للحصول على الراشح وبعد ذلك تم ترسيب الإنزيم بإضافة مترجة من الاسيتون البارد ( - 20 م إلى الراشح في حمام ثلجي مع التحريك المستمر (Magnetic stirrer)، وبعد الحصول على الراسب بواسطة النبد المبرد عُلق الراسب في محلول فوسفات البوتاسيوم (0.005 مولاري و pH = 7.8) وبلغ عدد مرات التنقية في هذه الخطوة 5.57 بحصيلة إنزيمية 46.80 % بالنسبة لتنقية الإنزيم من المجموعة (I)، بينما كان عدد مرات التنقية 4.51 بحصيلة إنزيمية 34.43 % بالنسبة لتنقية الإنزيم من المجموعة (II). تم بعد ذلك تخليص المحلول الإنزيمي من الأملاح قبل إمراره على عمود Sephadex G - 100 بواسطة الديلزة مع فوسفات البوتاسيوم. أُستُخدمت هذه الطريقة من (12) وكذلك من (13) في تنقية الإنزيم من كريات الدم الحمراء للإنسان. تنوعت الخطوات المتبعة في تنقية إنزيم SOD فضلا عن الطرائق أعلاه التي اعتمدت على استخدام المذيبات العضوية تم تنقية الإنزيم وفصل متناظراته في دراسات أخرى بالاعتماد على كروماتوغرافيا الألفة للهيبارين أو بالاعتماد على كروماتوغرافيا الألفة لل - Concavalin A (14). أعقب خطوة الديلزة خطوة الترشيح الهلامي من تمرير المحلول الإنزيمي على عمود Sephadex G - 100،

جدول (1): قيم فعالية إنزيم SOD في بلازما المرضى و مجموعة السيطرة .

بلازما المرضى من نوع Hb s/s				بلازما المرضى نوع Hb <sub>s</sub> /F				بلازما الاصحاء			
الفاصلية لإنزيم SOD في البلازما (RU/mL)	% للهيموغلوبين المنجلي	العمر (سنة)	الفئات العمرية	الفاصلية لإنزيم SOD في البلازما (RU/mL)	% للهيموغلوبين المنجلي	العمر (سنة)	الفئات العمرية	الفاصلية لإنزيم SOD في البلازما (RU/mL)	العمر (سنة)	الفئات العمرية	
15.3	85	10	الفئة العمرية (I) (25-10) سنة	15	84.5	10	الفئة العمرية (I) (19-10) سنة	24.45	10	الفئة العمرية (I) (24-10) سنة	
15	85.1	14		16.60	65.5	10		24.00	11		
15	85	15		15	84.8	11		24.45	13		
14.95	87	18		15	84.1	13		23.23	14		
15	86	18		18.52	44.2	14		23.90	15		
14.8	87	21		16	69.3	15		23.50	18		
14.8	87	25		16	69.4	19		23.50	21		
								23.90	22		
						23.50		24			
						23.50		24			
14.05	89.3	26	الفئة العمرية (II) (26-40) سنة	15	79.1	21		الفئة العمرية (II) (33-21) سنة	23.00	25	الفئة العمرية (II) (40-25) سنة
14.74	86	27		15	80.6	21			23.00	26	
15	85	30		15.22	70.3	22			23.00	27	
12.95	94.8	30		15.95	65	25			23.00	30	
14	88.2	33		15.3	70.2	26	22.18		33		
14.8	85.6	37		15.9	68	28	22.18		37		
13.22	89.9	40		15	74	33	22.18		38		
							22.18		38		
						21.13	40				
						21.13	40				

(P ≤ 0.01) لفعالية إنزيم SOD بين الفئات العمرية (I) و (II)

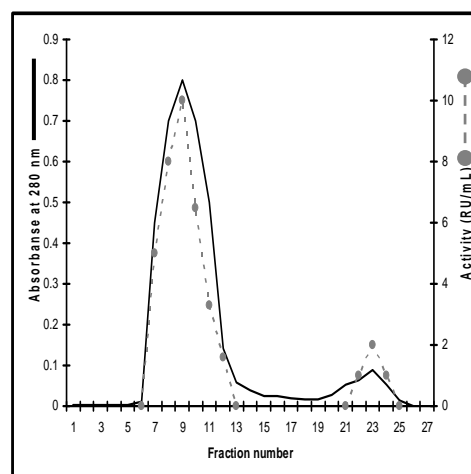
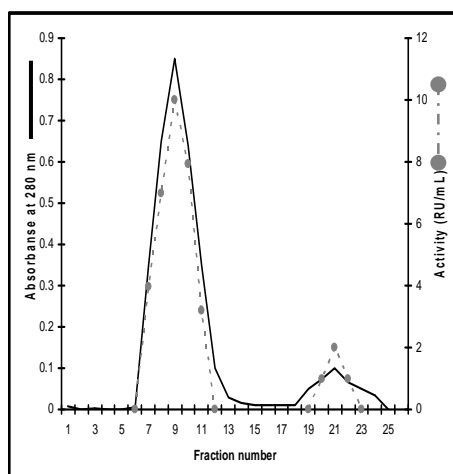
جدول (2): مستويات الزنك والنحاس في بلازما مجموعة السيطرة وبلازما مرضى فقر الدم المنجلي

من النوع Hb<sub>S</sub>/F والنوع Hb<sub>S</sub>/S.

البلازما		المجموعة
Zn ( $\mu\text{mol/L}$ )	Cu ( $\mu\text{mol/L}$ )	
$5.45 \pm 2$	$19.2 \pm 2.2$	Hb <sub>S</sub> /F
$5.48 \pm 2.12$	$19 \pm 2$	Hb <sub>S</sub> /S
$14.91 \pm 2.65$	$14.165 \pm 2.835$	Control

II

I



شكل (1): كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لتنقية إنزيم SOD من المجموعة ( I ) (بلازما الأشخاص الأصحاء) والمجموعة ( II ) (مزيج من بلازما مرضى فقر الدم المنجلي نوع Hb<sub>S</sub>/F ونوع Hb<sub>S</sub>/S). أبعاد العمود 48x2.5 cm والاسترداد بدائي فوسفات البوتاسيوم 0.2M, pH= 7.8.

جدول (3): خطوات تنقية إنزيم SOD من بلازما الأصحاء والمرضى.

خطوات التنقية	مصدر البلازما	الحجم ( ملتر )	الفعالية ( RU/mL )	تركيز البروتين (ملغم / ملتر)	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم )	الفعالية الكلية ( وحدة )	عدد مرات التنقية	الحصيلة الإنزيمية (%)
المستخلص الخام	الأصحاء	10	14.1	114.11	0.12	141	1	100
	المرضى	11	15	121.12	0.12	165	1	100
المعاملة مع كلوروفورم / ايثانول	الأصحاء	10.1	15.7	75.07	0.20	158.57	1.69	112.46
	المرضى	12	15.24	76.92	0.19	128.88	1.59	78.10
الترسيب الملحي بوساطة فوسفات البوتاسيوم الصلب (300gm/L)	الأصحاء	3	11.8	56.3	0.20	35.4	1.69	25.10
	المرضى	3.9	14.02	57.59	0.24	54.67	1.96	33.13
الترسيب بوساطة الأستون	الأصحاء	6	11	16	0.68	66	5.57	46.80
	المرضى	6	9.47	16.92	0.55	56.82	4.51	34.43
الدليزة مع فوسفات البوتاسيوم	الأصحاء	6.4	10	11.5	0.86	64	7.036	45.39
	المرضى	6.5	9	12.18	0.73	58.5	5.96	35.45
الترشيح الهلامي بعمود Sephadex G-100	الأصحاء	15	6.8	7.5	0.90	102	7.33	72.34
	المرضى	15	7.13	8.19	0.87	106.95	7.03	64.81

- erythrocyte cuproprotein (erythrocuprein). J. Biol. Chem. 234: 40 – 50.
13. Keele, B.B.; McCord, J.M. & Fridovich, I. (1970). Further characterization of Bovine Superoxide Dismutase and its isolation from Bovine heart. The Journal of Biological Chemistry. 19: 2875 – 2880.
14. Price, D.; Sangram, S.S. & Borchelt, D.R. (1998). Cited by Al-Habal, M.H. (2001). superoxide dismutase isoenzymes and some of trace elements in the plasma of patients with breast tumors. MS.C. thesis. Chemistry Department. College of Science. Baghdad University.
- ### المصادر
- ### References
1. AL-Omar, MA. ; Christine Beedham. & Alsarra, IA. (2004). Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanisms. Saudi Pharmaceutical Journal. 12: 1-18.
  2. Fattman , C.L. ; Enghild , J.J. ; Crapo , J.D. ; Schaefer , L.M. ; Valnickova , Z. & Oury , T.D. (2000) . Purification and characterization of Extracellular Superoxide Dismutase in Mouse lung. Biochemical and Biophysical Research Communications. 275: 542-548.
  3. Proctor, P.H. & Reynolds, E.S. (1984). Free radicals and disease in man. Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR. 16: 175 – 195. [Review].
  4. Hean, J.P. (1995). Principles of hematology. Wm. C. Brown publishers. U .S .A. P,455
  5. Beyer, W.F. & Fridovich, I. (1987). Assaying for Superoxide Dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. Anal. Biochem. 161: 559 – 566.
  6. Kimmel, J.R.; Markowitz, H. & Brown, C.M. (1959). Some chemical and physical properties of erythrocuprein. J.Biol.Chem. 234: 46-50.
  7. McCord, J. M. & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein ( hemocuprein ) . J. Biol. Chem. 244: 6049-6055.
  8. Prasad, A.S. ; Schoomaker , E.B. ; Ortega , J. ; Brewer , G.J. ; Oberleas , D. & Oelshlegel , F.J. Zinc deficiency in sickle cell disease . Clin.chem. 21/4:582– 587.
  9. Reeves, P.G.; Briske –Anderson, M. & Johnson, L. (1998). Physiologic concentrations of Zinc affect the kinetics of Copper uptake and transport in the human intestinal Cell Model , Caco-2. The Journal of Nutrition. 128: 1794-1801.
  10. Fischer, P.W.; Giroux, A. & Labbe, M.R. (1981). The effect of dietary zinc on intestinal copper absorption. Am. J. Clin. Nutr. 34:1670- 5.
  11. Fischer, P.W.; Giroux, A. & Labbe, M.R. (1983). Effects of zinc on mucosal copper binding and on the kinetics of copper absorption . J. Nutr. 113: 462 - 9. Fisher, P.W.; Giroux, A. & Labbe, M.R. (1981). The effect of dietary zinc on intestinal copper absorption. Am. J. Clin. Nutr . 34: 1670 - 5.
  12. Markowitz, H.; Cartwright, G.E. & Wintrobe, M.M. (1959). Studies on Copper metabolism. XXVII. The isolation and properties of an