

أيجاد الجرعة الإشعاعية لأقصى حالة تأثير على خضاب الدم البشري باستخدام ثلاثة تقنيات مطيافية مختلفة (UV-visible , CD, FTIR)

حسين علي الجبوري

جامعة النهريين ، كلية العلوم ، قسم الفيزياء .

الخلاصة:

تم أيجاد حدود الجرعة الإشعاعية من أشعة كما لأحداث أقصى تأثير على خضاب الدم البشري باستخدام التقنيات المطيافية التالية :

• الضوء المرئي وفوق البنفسجي ; UV-visible

• التلونية الدائرية ; Circular Dichroism , CD

• تحول فوري - تحت الحمراء ; Fourier Transform Infrared, FTIR

وجد أن الحد الأقصى للتأثير على الخضاب هو بحدود الجرعة 1.0 غراي لكل من تقنية UV-visible وتقنية مطيافية التلونية الدائرية - CD في حين أن حدود الجرعة لنفس التأثير كان بمدى الجرع 0.5-1.0 غراي لتقنية مطيافية تحول فوري - تحت الحمراء FTIR . تم أعزاء اشتراك تقنية UV-visible وتقنية التلونية الدائرية - CD في أعطاء نفس جرعة الحد الأقصى 1.0 غراي وذلك لكونهما تتناول التغير الحاصل في الجزء الهيمي الحاوي على ذرة الحديد بالإضافة إلى التأين الحاصل بفعل الإشعاع من Fe^{+2} إلى Fe^{+3} ، في حين أن تقنية- FTIR تتناول الجزء البروتيني من الخضاب.

المقدمة:

للخضاب، وتفريق حالة البروتين المرتبط بأيون Fe^{+2} عن مثيله المرتبط مع Fe^{+3} (16) ووصف الميثاموغلوبين MetHb- بقياس تدويرية البروتين الداخل في تركيبه و أنتقال التحول من البرم العالي إلى البرم الواطئ في أيون Fe^{+3} لمجموعة الهيم المرتبط بأيون السانيد - CN (17) أو بللفعل المؤين لأشعة كما في تحول أيون الحديد(18).

كما استخدمت تقنية CD- في أيجاد التغير الحاصل على تركيبية الخضاب عند درجة حرارة الجسم (19)، وباستخدام نفس التقنية مع تقنية الفلورة في دراسة تأثير الأس الهيدروجيني PH- على الخضاب (20) في حين استخدمت تقنية طيف أشعة تحت الحمراء IR- في دراسة التغيرات الحاصلة على البروتينات عامة (21,22) وصولاً إلى الخضاب (23) للتعرف على بعض العوامل الفيزيائية، كحالة التأين والبرم النووي (24) والتفاعل الكولومبي التناظري (25) وتفاعل البروتينات الهيمية في الخضاب، وتخمين المحتوى البروتيني فيه (26) وتصنيف طيف الخضاب حسب المديات الرابطة، Amide-I, Amide-II, Amide-III (27) التي تمتد من العدد الموجي 1350 سم⁻¹ إلى العدد الموجي 1800 سم⁻¹. كما استخدمت تقنية

استخدمت تقنية الضوء المرئي UV-visible مع أغلب مشتقات الخضاب في دراسة تأثير عوامل فيزيائية كثيرة منها الحرارة والضغط والتأثير لإشعاع ي لأشعة كما (1,2,3) ومتابعة التحول للخضاب المؤكسج HbO₂ إلى خضاب الميثاموغلوبين - MetHb عند الجرعة الإشعاعية العالية، وفي تحديد بعض مناطق الطيف التي يبد أ فيها التغير الطيفي أو الانحراف ألقممي(4)، ودراسة مشتقة الطيف في تفسير التغيرات الطيفية الحاصلة نتيجة التآثيرات الإشعاعية لأشعة كما عند مستوى الجرعة الواطئة(5) والعالية (6,7).

كما استخدمت تقنية التلونية الدائرية Circular Dichroism - CD مع الخضاب في دراسة تأثير الحرارة (8) والأس الهيدروجيني-pH (9) وحالة التبادل في الأحماض الأمينية لجزيئة الخضاب (10) ومتابعة تفاعلات هيم- هيم الخضاب (11,12) وتفاعلات مدار- مدار في ذرة حديد مجموعة الهيم في الخضاب (11, 12)، وارتباط الهيم مع بروتين الخضاب المختزل باستخدام المذبيبات العضوية (14)، أو الخضاب المؤكسج - HbO₂ والمختزل Hb (15) وملاحظة الاختلاف الحاصل في الألفة الجزيئة

النموذج النهائي لسائل الخضاب تركيز (10×2^{-4} مول). يجفف نموذج الخضاب بشكل مسحوق بطريقة التجفيد لمدة 24 ساعة (26)، ويؤخذ مسحوق نموذج الخضاب المجفف ويخلط مع مسحوق بروميد البوتاسيوم - KBr ويكبس على شكل قرص تحت ضغط 180 كغم. سم² لمدة 5 دقائق (28) ليكون مهياً للقياس في تقنية - FTIR، يؤخذ طيف FTIR- لنماذج مساحيق الخضاب غير المشع والمشع باستخدام جهاز نوع Perkin Elmer موديل FTIR: 720 X ثم يتم حساب نسبة الشدة R- لكل نموذج وذلك من خلال المقارنة مع العدد الموجي 1450 سم⁻¹، واعتمدت نسبة الشدة R- بعد أخذ طيف FTIR لنماذج الخضاب المقاسة وذلك مقارنة بالعدد الموجي 1450 سم⁻¹ (27) لطيف كل نموذج.

النتائج والمناقشة:

يبين (الشكل - 1) التغير في صافي قيمة المشتقة الأولى (تغير امتصاصية الطيف - dA) مع تغير الطول الموجي - $d\lambda$ لطيف نماذج الخضاب عند قمة الطول الموجي 650 ن.م. المعرف بالمعامل 650 $\Delta(dA/d\lambda)$ والتي قيست بنفس أسلوب تلك المشتقة كدالة لتكوين خضاب MetHb - (18) مع جرع تشعيع الخضاب، ويلاحظ من الشكل (1) الزيادة الواضحة في صافي قيمة المشتقة إلى أن تستقر بحدود الجرعة 1.0 غراي. وعند رسم المشتقة الرابعة ($d^4A/d\lambda^4$) لطيف نماذج الخضاب غير المشع والمشع بجرع 0.5 و 1.0 غراي يلاحظ وجود تذبذب في الطيف عند قمة الطول الموجي 650 ن.م. وأن سعة هذا التذبذب يزداد بزيادة الجرعة الإشعاعية للخضاب حتى يصل إلى أقصى نسبة له قبل التحول إلى حالة الاشباع وذلك عند قيمة 67% عند حسابها نسبة إلى خضاب MetHb (الذي مثل نسبة التذبذب 100%) عند حدود الجرعة 1.0 غراي شكل (2) وشكل (3)، إي أن الحد الأقصى لتغير خضاب الدم نتيجة التشعيع هو بحدود هذه الجرعة، وعند قياس الطيف المرئي لنماذج الخضاب المشععة وغير المشععة وإيجاد صافي ارتفاع -H وعرض -W لقمة الطول الموجي 414 ن.م. في الطيف وحساب المعامل $414(1-H/W)$ منهما، وجد إن هذا المعامل يصل إلى أقصى قيمة له عند الجرعة 1.0 غراي

- FTIR في التعرف على حدود الأنجماد الحاصل في الخضاب الكربوني - HbCO من درجة حرارة 293 إلى 190 كلفن (28) وفترة حفظ الخضاب (29)، بالإضافة إلى استخدام التقنية في إيجاد صفات الخضاب مع زيادة قطبية مجموعة هيم نوع - β وهيم نوع - α (30) تم في دراستنا الحالية استخدام التقنيات المطيافية الثلاث (UV-visible,) (CD, FTIR) لقياس الاستجابة الإشعاعية لخضاب الدم البشري وإيجاد جرعة الحد الأقصى للتأثير ومناقشة النتائج مع الدراسات السابقة.

المواد وطريقة العمل:

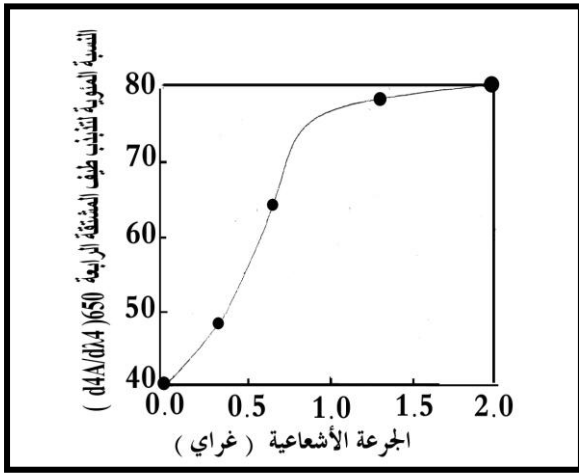
يؤخذ الدم الوريدي المسحوب حديثاً ويوضع من متبرعين سالمين من الأمراض السارية والمعدية في حاويات مانعة للتخثر (تحوي-EDTA 1%) وتفصل البلازما عن كريات الدم الحمراء بالنبذ المركزي 3000 دورة / الدقيقة لمدة 10 دقائق، يستخدم محلول الفيزيولوجي (NaCl 0.9%) بعد فصل العالق - البلازما لغسل الكريات المترسبة. يعاد عزل الكريات بالنبذ المركزي وتغسل بنفس الطريقة السابقة لثلاث مرات متتالية. ثم تعلق الكريات بالمحلول الفيزيولوجي لتكوين محلول عالق حاو على الكريات ، ثم يخفف المحلول بالماء الخالي من الأيونات بتركيز 10% ويترك لمدة 5 دقائق ثم يتم التخفيف للحصول على التركيز المناسب (10×2^{-4} مول) من محلول الخضاب (31). يتم تحضير الميثاموغلوبين - MetHb وذلك بإضافة 100 مللتر من محلول $K_3Fe(CN)_6$ (200 غرام / لتر) إلى 10 مللتر من محلول الخضاب السابق حيث يتم تحويل كافة الخضاب إلى MetHb الذي تؤخذ قياس الامتصاصية عند الطول الموجي 630 ن.م.(32).

تم التشعيع باستخدام مصدر كوبلت - 60 من جهاز Gamma Cell -900 وحساب معدل الجرعة بطريقة مجراع فيرك - Fricke dosimeter (33).

حيث تم تشعيع نماذج الخضاب ضمن مدى جرع 0.25 - 10 غراي بمعدل جرعة 9.5 غراي/ دقيقة لتكون مهيئة للقياس في تقنية UV-visible وتقنية - CD وضمن مدى جرع 0.05, 0.5, 1.0, 3.0 غراي عند معدل جرعة 5.1 غراي/ دقيقة لتكون مهيئة للتجفيد ثم القياس في تقنية FTIR. ولتحضير مسحوق الخضاب يؤخذ 5 مللتر من

قبل التحول إلى حالة الإشباع كما يوضحها الشكل (4)
ويكافئ قيمة المعامل $414(1 - H/W)$ المحسوب
لخضاب -MetHb، ولكون الأخير يمثل حالة تحول كامل
لأيونات Fe^{+2} إلى Fe^{+3} ، يمكننا أن نستنتج من ذلك بأن
أغلب الحديد الموجود في الخضاب قد تمت أكسدته إلى
 Fe^{+3} بفعل التأثير المباشر لأشعة كاما عند الجرعة 1.0
غراي.

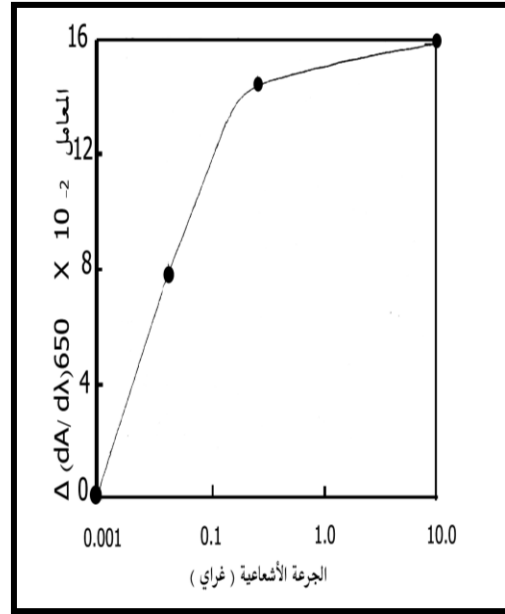
شكل (2) : تذبذب طيف المشتقة الرابعة $(d^4A/d\lambda^4)$
مع الجرعة الإشعاعية للخضاب.



شكل (3) : تغير النسبة المئوية لتذبذب طيف المشتقة
الرابعة $(dA/d\lambda)$ 650 مع الجرعة الإشعاعية المعطاة
للخضاب لغاية الجرعة 0.5 غراي

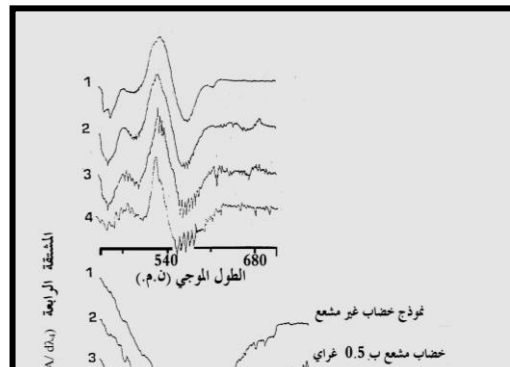
إلى نموذج الخضاب غير المشع كانت أقصى قيمة تغير
له عند الجرعة 1.0 غراي ومقدارها $\lambda = -5.7 \times 10^6$ ،
فيما تصل قيمتها لخضاب -MetHb غير المشع إلى
 $\lambda = -5.5 \times 10^6$ حيث تتطابق مع نظيرتها عند الجرعة
1.0 غراي.

في حين يبين شكل (6) التغير الحاصل في الأهلجية
المولارية النسبية $\lambda(\theta)$ Rel. درجة. سم². مول⁻¹ لنماذج
الخضاب المشعة وغير المشعة لطيف تقنية التلونونية
الدائرية - CD (20) ويمدى طيف موجي 200-240 ن.م.
ويلاحظ من شكل (6) أن زيادة الجرعة الإشعاعية بمدى
1.0-0.05 غراي تؤدي إلى اختفاء أشباه القمم عند القمة
222 ن.م. في نماذج الخضاب المشعة، ويكون أقصى تغير
عند الجرعة 1.0 غراي ويختفي بعدها في خضاب -
MetHb غير المشع، مما يدل إلى إن أقصى تحول في



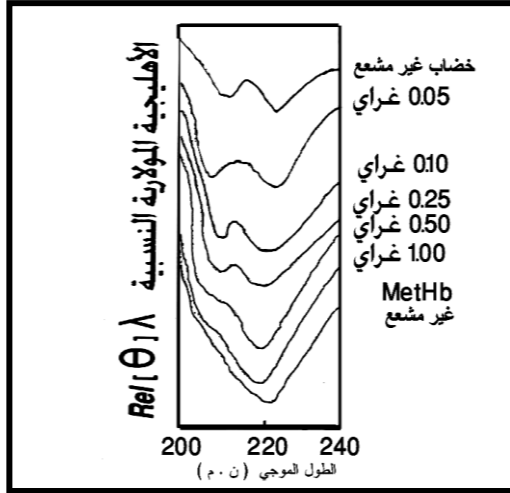
شكل (1) : صافي المشتقى الأولى $(dA/d\lambda)$ 650
للطيف المرئي للخضاب عند القمة 650 ن.م. مع الجرعة
الإشعاعية (غراي) المعطاة للخضاب لغاية الجرعة 10
غراي.

شكل (5) يبين التغير الحاصل في الأهلجية المولارية λ
[[θ]] في طيف التقنية التلونونية الدائرية CD- عند قمة
الطول الموجي 222 ن.م. مع زيادة الجرعة الإشعاعية
المعطاة للخضاب بمدى جرعة 0.1 لغاية 1.0 غراي ويمدى
طيف موجي 200-240 ن.م. حيث يلاحظ أن مقدار الهبوط
في قيمة القمة 222 ن.م. ينحصر في هذا المدى وإذا قيس
الهبوط نسبة.



حسين علي الجبوري

وعند استخدام تقنية FTIR وإيجاد نسبة الشدة -R والتي تم حسابها بالمقارنة مع العدد الموجي 1450 سم^{-1} لمواقع حزم امتصاص المديات الرابطة Amide-Amide-II III، Amide-I (27) لنماذج الخضاب المشعة بمدى جرع 0.05, 0.5, 1.0, 3.0 غراي) وغير المشعة ووجد إن أعلى تغير في قيمة نسبة الشدة -R يظهر في المدى الرابط Amide-I عند الجرعة 0.5 غراي (الشكل 7-7) ضمن حدود العدد الموجي $1652-1655\text{ سم}^{-1}$ وبقيمة 11.0 سم^{-1} مقارنة بنموذج السيطرة بقيمة 10.0 سم^{-1} (الشكل 8)، في حين وصلت



شكل (6) : الاهليجية المولارية النسبية $\lambda(\theta) \text{ Rel}$ من طيف الثلونية الدائرية -CD بمدى الطول الموجي 200-240 ن.م. لخضاب الدم البشري المشع بمدى تشعيعي 0.05-1.00 غراي.

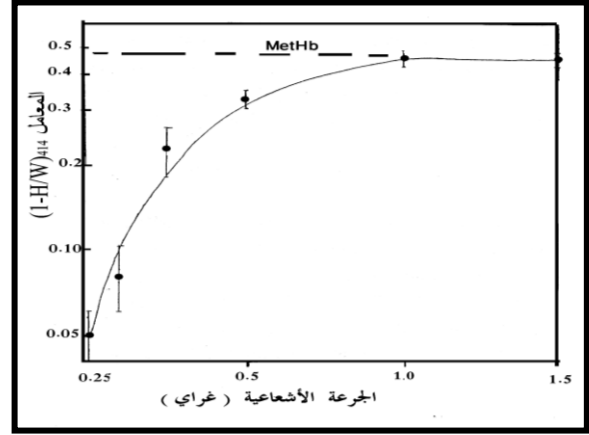
(أ) أخذت القيمة $\lambda(\theta) \text{ Rel}$ نسبة لقيمة $\lambda(\theta)$ في الخضاب غير المشع.

(ب) تمت مقارنة $\lambda(\theta) \text{ Rel}$ بقيمتها لدى الميثاموغلوبين -MwtHb

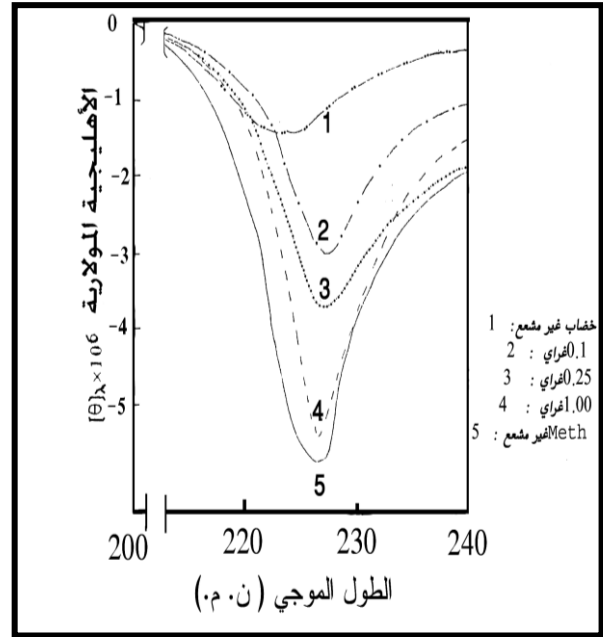
أعلى قيمة لنسبة الشدة -R عند المدى الرابط

Amide-II عند الجرعة 0.5 غراي ضمن حدود العدد الموجي $1543-1545\text{ سم}^{-1}$ بقيمة 6.6 سم^{-1} عند مقارنته بنموذج السيطرة بقيمة 6.1 سم^{-1} ، ولم يظهر اختلاف يذكر على مواقع المديات الرابطة في هذه الجرعة للمدى Amide-III ضمن حدود العدد الموجي 1390 سم^{-1} ، من ذلك نستدل بأن الجزء البروتيني في جزيئة الخضاب والذي يمتلك امتصاصية عند المدى الرابط Amide-I هو الأكثر

قيمة $\lambda(\theta)$ كان عند الجرعة 1.0 غراي، وان حالة التأين الكامل للحديد في خضاب -MetHb غير المشع أصبحت مكافئة لحالة الخضاب المشع بجرعة 1.0 غراي.



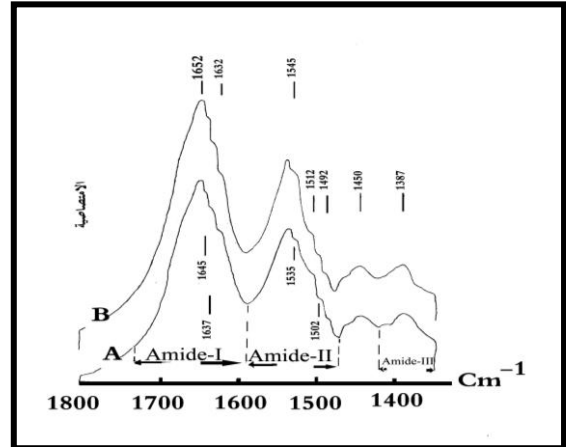
شكل (4) : العلاقة بين المعامل $(1-H/W)_{414}$ في الطيف المرئي لخضاب الدم البشري المشع بجرع 0.05-1.0 غراي. H, W صافي عرض وارتفاع القمة 414 ن.م.



شكل (5) : طيف الثلونية الدائرية -CD عند القمة 222 ن.م. مع زيادة الجرعة الاشعاعية للخضاب (0.1-1.0 غراي) مقاسا بقيمة الاهليجية المولارية $\lambda(\theta)$ مقارنة بالميثاموغلوبين -MetHb.

وعند مقارنة الشكل (5) و الشكل (6) نجد أن الهبوط الحاصل في قيمة $\lambda(\theta)$ مع زيادة جرع تشعيع الخضاب حتى الجرعة 1.0 غراي يكافئ أو يقترب من قيمتها في خضاب -MetHb الغير مشع.

حساسية لتأثير الإشعاع من خلال الارتفاع في قيمة نسبة الشدة R- نتيجة لتشيع الخضاب والذي يمكن قياسه.



الشكل (9) : نسبة الشدة-R مع جرع التعرض الإشعاعي للخضاب مقاسة بـ (غراي) عند الاعداد الموجية 1545 ، 1535 ، 1512 ، 1502 ، 1492 سم⁻¹ للمدى الرابط .Amide-II

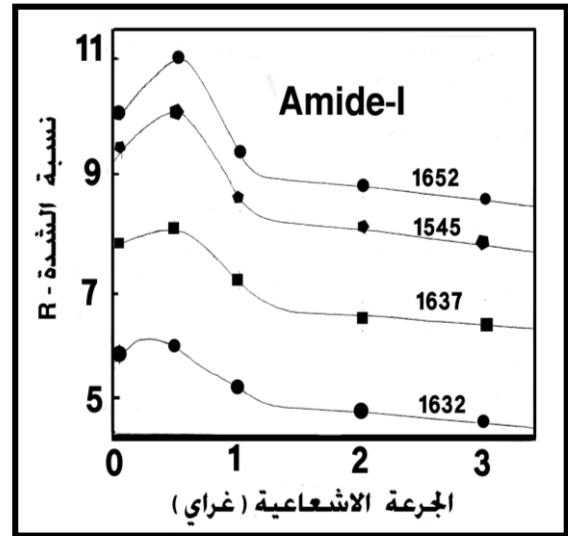
جرعة الحد الأقصى للتأثير على الخضاب (غراي)	تقنية مطيافية
~ 1.0	الضوء المرئي وفوق البنفسجي UV- visible
~ 1.0	التلوننية الدائرية - CD
~ 1.0-0.5	تحول فورييه تحت الحمراء FTIR -

شكل (7) : أمصاصية طيف الـ FTIR لخضاب الدم البشري مع العدد الموجي بوحدة سم⁻¹، Cm⁻¹ والمحضّر بطريقة KBr .

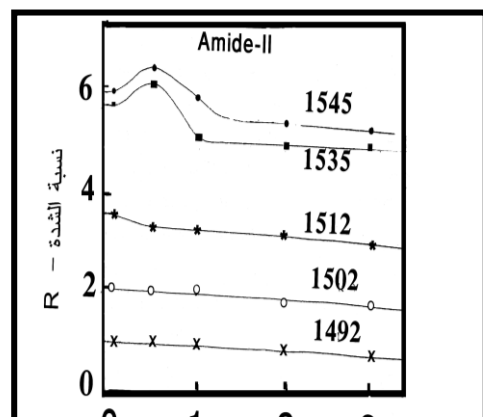
A : خضاب غير مشع (نموذج سيطرة).
B : خضاب مشع بجرعة 0.5 غراي التي تظهر اعلى استجابة أشعاعية في الطيف.

في تقنية FTIR-، ويتفق في هذا الرأي في دراسة مماثلة أجريت على ثلاث أنواع من البروتينات باستخدام نفس التقنية(27).

كذلك يلاحظ من خلال شكل (8) إن الزيادة في قيمة نسبة الشدة-R عند المدى الرابط Amide-I مع الجرعة الإشعاعية المعطاة للخضاب والتي تصل أقصاها عند الجرعة 0.5 غراي عند الإعدادات الموجية 1652، 1637، 1632 سم⁻¹ المعتمدة لنموذج السيطرة، تبدأ هذه الزيادة في قيمة نسبة الشدة-R بعد الجرعة 0.5 غراي بالانخفاض (تغاير في السلوك) لغاية الجرعة 1.0 غراي والاستقرار لغاية الجرعة 3.0 غراي، يتكرر هذا التصرف في المدى الرابط Amide-II عند العددين الموجيين 1545، 1535 سم⁻¹ المرجعية لنموذج السيطرة كما موضح في شكل (9) دون ظهور إي تعبير في قيمة نسبة الشدة-R على بقية الإعدادات الموجية، في حين لا يبدو هناك اختلاف في قيمة نسبة الشدة-R عند المدى الرابط Amide-III عند العدد الموجي 1387 سم⁻¹.



شكل (8) : نسبة الشدة-R مع جرع التعرض الأشعاعي مقاسة بـ (غراي) عند الاعداد الموجية 1645 ، 1652 ، 1637 ، 1632 سم⁻¹ بالمدى الرابط Amide-I.



- [2] Zwart, A., Spectra 2000 (111supp): 39-43 (1986).
- [3] Zart, A., Clin. Chem. 32(6): 972-978 (1986).
- [4] Arena, V., in "Ionizing Radiation and Life, an Introduction to Radiation Biology and Biological Radiotracer Methods" p:317-320 (1971).
- [5] Lewand, Z., Puchala, M., Osmulsk, P. A., Radiat. Environ. Biophys. 28 (1) 39-46 (1989).
- [6] Zdravko, B. L. and Panasyak, E. N., Zpsba 45 (6): 971-975 (1986).
- [7] Zdravko, B. I. and Panasyak, E. N, J. Appl. Spectrosc.45(6): 971-975 (1986).
- [8] Shayonov, Ya. A., Mineyes, A. P. Livshitz, M. A. and Sharonova, N. A., Biophysics Structure Mechanism, 4 : 139-158 (1978).
- [9] Vickery, L., Nozawa, T. and Saner, K., J. Am. Chem. Soc. 98(2): 351-357 (1976).
- [10] Nagai, M., Takama, S. and Yoneyama, Y.A., Theoret. Chim. Acta (Berl) 49: 295-307 (1978).
- [11] Sono, M. and Dawson, J. H., Biochem. Biophys. Acta. 789 (2): 789:170-187 (1984).
- [12] Sono, M. and Dawson, J. H. and Ikeda Saito, M., Biochimica Biophysica Acta 873: 62-72 (1986).
- [13] Alexander, P., Mineyey and Sharonov, Y. A., Theoret. Chim, Acta (Berl) 49 295-307 (1978).
- [14] Zentz, C. EL. Antri, S., Pin, S. Cortes, R. Massat, A., Simon, M. and Albert, B. Biochemistry 30 (11):2804-2810 (1991).
- [15] Eaton, W. A Hanson. L. K. Stephens, P. J. Sutherland. J. C. and Dunn, J. B. R., J. Amer. Chem. Soci. 100 (16): 4991-5008 (1978).
- [16] Al-Shaickly, M. A. and Al-Jobouri, H. A., Iraq. J. Sci. 40: (B) no.1, 9-20 (1999).
- [17] Cheesman, M. R. Watomough, N. J., Gennis, R. B., Green wood, C. and Thomson, A. J., Eur. J. Biochem. 219 (1-2) 595-602 (1994).
- [18] Spinks, J. W. T., in "an Introduction to Radiation Chemistry" p. 93-102 (1976).
- [19] Artman, G. M., Burns, L., Canaves, J. M., Temiz-Artmann, A., Schmid-Schoubain, G. W., Chien S., Maggakis-Kelemen, C., Eur. Biophys. J; 33 (6):490-496 (2004).

يتبين من ذلك إن مدى جرع التغير لنماذج الخضاب كما يوضحها شكل (8) في حالة المدى الربط Amide-I هو بحدود مدى جرع 0.5-1.0 غراي ثم يبدأ بالاستقرار لغاية الجرعة 3.0 غراي، وهذا المدى هو مدى التغير في الخضاب في هذه التقنية. لذا اشتركت كل من مطيافية UV-visible ومطيافية - CD في أعطاء الحد الأقصى للتأثير على الخضاب بالجرعة 1.0 غراي (الجدول (1)، وذلك لكون أن تقنية UV-visible تتناول طيف جزيئة الخضاب ككل، في حين إن تقنية CD تتناول استقطاب جزيئة الخضاب والذي ظهر أن أعلى استقطاب للجزيئة يظهر عند الجرعة 1.0 غراي. بينما أعطت تقنية - FTIR مدى تغير من 0.5-1.0 غراي وذلك لكون طريقة حساب نسبة الشدة R- في التقنية يعتمد على الجزء البروتيني فقط في جزيئة الخضاب، والذي ظهر انه يمتلك أعلى امتصاصية عند Amide-I الأكثر حساسية لتأثير الإشعاع. لذا يتضح انه لإيجاد قيمة الحد الأقصى للتأثير على الخضاب يمكن التركيز على تقنية UV-visible وتقنية -CD وذلك لكونها أعطت قيمة متقاربة لكلا منهما، ولكون أن كلا التقنيتين تتناول التأثير الحاصل على الجزء الهيمي الحاوي على مجموعة الهيم-Heme group الحاوي على ذرة الحديد والذي يتأثر بالإشعاع نتيجة التأين الحاصل في ذرة الحديد من Fe^{+2} إلى Fe^{+3} . ويمكن دراسة قيمة الحد الأقصى لتأثير جرعة 1.0 غراي بدقة والتركيز عليها في دراسات لاحقة لإيجاد القيمة الدقيقة في التأثير لكلا التقنيتين واخذ مدى جرع 0.5-1.0 غراي الذي أعطته تقنية -FTIR.

كما بينت الدراسة انه في حالة تناول تأثير أشع ة كما على الجزء الهيمي والحوي على ذرة الحديد - Fe في الخضاب لابد من التركيز على تقنية - CD وتقنية UV-visible في حين عند تناول تأثير أشع ة كما على الجزء البروتيني لابد من استخدام تقنية - FTIR.

References

- [1] Brown, L.J., IEEE Transaction on Biomedical Engineering vol. 27 (3): 132 (1980).

- [20] Girigoswami, A. Des., J. Colloid. Interface Sci. 1: 296 (1) 324-231,(2005).
- [21] Casal, H. L., Z. Naturforsch. Sect. C. Biosci. 42 (11/12): 1339-1342 (1987).
- [22] Schutte, C. J. H. and Zachmann, G., S. Afr. J. Sc., SAJSA, 81 (10): 598-599, (1985).
- [23] Cordoue, L. Cupane, A., Leone. M. and Vitrano, E., Biophysical Chemistry 24: 259-275 (1986).
- [24] Yamamoto, T. and Palmer, G., J. Boil. Chem. 218 (14): 5211-5213 (1973).
- [25] Juckett, D. and Hultqaist, D., Biophys. Chem, 19 (4): 321-335 (1984).
- [26] Susi, H, Byler, D. M. and Pureel, J. M., J. Biochem. Biophy. Meth.11: 235-240 (1985).
- [27] Kaiden, K Matsui, T. and Tanaka, S., Appl. Spectro. 41 (2): 180-184 (1987).
- [28] Mayer, E and Astl, G., Ultra Microscopy 45 (2):185-197(1992).
- [29] Sassarol, M and Roussean D. L. Biochemistry 26: 3092-3098(1987).
- [30] Karavitis, M. and Fronticelli,C., J. Biol. Chem. vol. 273, Issue 37, 23740–23749 (1998).
- [31] Anderson, O. S., Pedersan, B. N. and Rem. J., Clinical. Chem. Acta 42, 85-100 (1972).
- [32] Simon, J. R. H. and Benutt, Clin. Chem. Acta 153: 253-257 (1985).
- [33] Spinks, J. W. T. and Wood, J. J. "An Introduction to Radiation Chemistry", John Wiley & Sons, New York, p;93-102, (1976).