

ENZYME SUPEROXIDE DISMUTASE - MỘT THẮNG LỢI CỦA CÔNG NGHỆ ENZYME NỬA SAU THẾ KỶ 20

Đống Thị Anh Đào - Nguyễn Đức Lượng
Trường Đại học Kỹ thuật

Lê Văn Nhung
Viện Công nghệ Sinh học & Thực phẩm Trường Đại học Bách khoa Hà nội

Yumi Yoshikawa - Kanji Matsumoto
Faculty of Engineering - Yokohama National University
(Bài nhận ngày 18/10/1999)

I. GIỚI THIỆU ENZYME SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD)

Enzyme Superoxide Dismutase EC 1.15.1.1.(được gọi tắt là SOD) là enzyme oxy hóa khử (Oxydoreductase), thuộc loại metalloprotein. Enzyme Superoxide dismutase xúc tác cho phản ứng oxy hóa khử, loại trừ gốc điện tử tự do superoxide O_2^- là độc tố oxy được sinh ra trong tế bào sống của cơ thể sống. Enzyme SOD đã được tìm thấy lần đầu tiên cách đây khoảng 60 năm bởi Mann và Keilin. Vào năm 1938 Mann và Keilin đã tách được từ máu bò một protein mang màu xanh gần giống với màu của ion Cu^{2+} , có phân tử lượng khoảng 35000 Da, có chứa khoảng 0,38% nguyên tố đồng, đã được gọi với những tên như haemocuprein hoặc erythrocuprein (viết tắt của haemoglobin-cupric-protein hay erythrocyte-cuproprotein). Vào thời điểm đó chưa xác định được tính năng xúc tác quan trọng của SOD và chỉ được biết như là một loại protein phức có chứa nguyên tố đồng. Khi O_2^- và đặc tính của nó được khám phá thì đặc tính xúc tác của SOD cũng được phát hiện vào năm 1962 bởi Joe Mccord and Irwin Fridovich. Đến năm 1968, J. Mccord and I. Fridovich đã thực hiện lại thí nghiệm thu nhận SOD từ hồng huyết cầu của bò, và sau đó đã nghiên cứu xác lập được phương pháp định lượng hoạt tính của SOD, từ đó SOD được khẳng định là một enzym. J. Mccord và I. Fridovich đã công bố công trình nghiên cứu phát hiện enzyme SOD vào năm 1969. Đến năm 1970, ion Zn^{2+} tồn tại trong nhóm coenzyme của phân tử SOD được phát hiện. Tiếp theo đó Công cuộc nghiên cứu SOD được thực hiện không ngừng bởi các nhà khoa học trên thế giới và tiến triển khá nhanh chóng trong vòng 30 năm qua.

SOD đã được khẳng định tồn tại trong tế bào sống của các loài sinh vật hiếu khí, là tác nhân duy nhất có thể giải độc cho tế bào trong việc loại trừ độc tố oxy superoxide O_2^- sinh ra trong quá trình trao đổi chất trong tế bào. Những

thành tựu về nghiên cứu SOD được xem là những thắng lợi to lớn của ngành công nghệ enzyme ở thế kỷ 20, những thắng lợi này đã góp phần quan trọng cho tiến bộ y học. Các nhà hóa học và y học đã nghiên cứu được sự liên quan mật thiết giữa một số bệnh tật và chức năng xúc tác của SOD, đã áp dụng tính năng của SOD trong chuẩn đoán bệnh và thực nghiệm điều trị lâm sàng một số bệnh, chống lão hóa và bảo vệ tế bào. Một trong những phương hướng hiện nay của công nghệ sinh học là nghiên cứu phát hiện SOD từ nhiều nguồn nguyên liệu phong phú dễ tìm, đặc biệt chú ý đến nguồn nguyên liệu vi sinh vật, nghiên cứu trích chiết, tinh chế và ứng dụng SOD vào các ngành thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm.

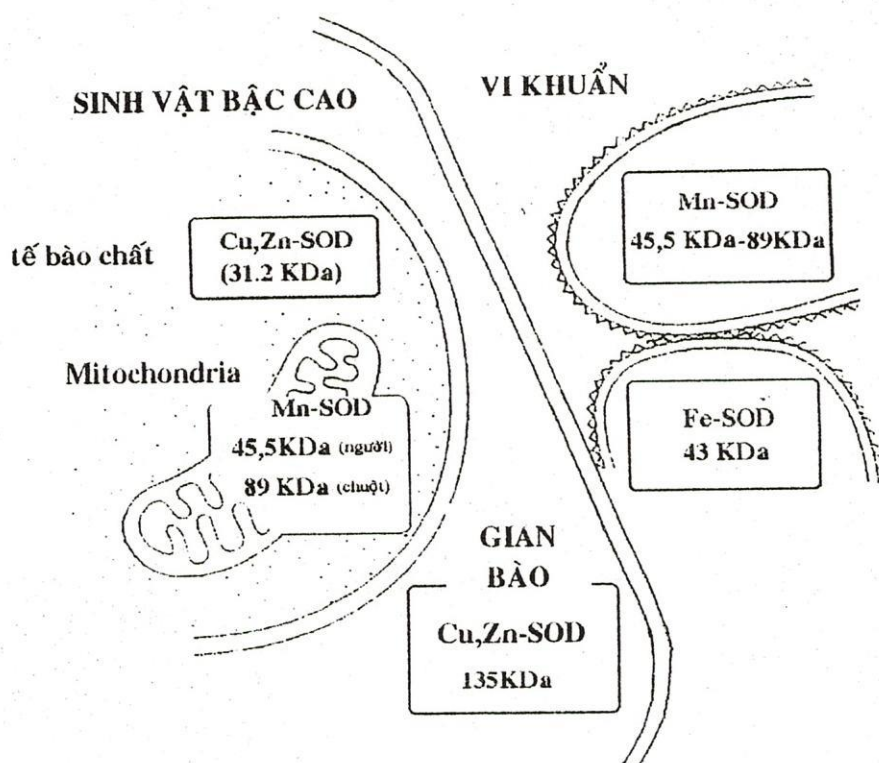
II PHÂN LOẠI_CẤU TRÚC _PHÂN BỐ SOD TRONG TẾ BÀO

SOD thuộc loại metalloprotein, phân tử SOD (holoenzyme) bao gồm cộng tố kim loại (cofactor) và apoenzyme. cộng tố kim loại tùy theo loại SOD có thể là Cu^{2+} và Zn^{2+} , hoặc Mg^{2+} hoặc Fe^{2+} . Apoenzym của SOD là chuỗi polypeptid xoắn kép gồm hai sợi giống nhau, mỗi sợi polypeptit nối với nhau bởi cầu nối disulfua(-S-S-), một nhóm Sulhydryl và một sản phẩm amino acetyl hóa cuối cùng, số acid amin và vị trí các acid amin trong chuỗi polipeptid khác nhau tùy theo nguồn nguyên liệu.

Tùy theo ion kim loại được mang ở cộng tố mà SOD được phân thành ba loại như sau: Cu,Zn-SOD (Coper, zinc-superoxide dismutase), có chứa một ion Cu^{2+} và một ion Zn^{2+} , Mn-SOD (Mangan-superoxide dismutase) có chứa một ion Mn^{2+} trong cộng tố và Fe-SOD (Ferri-superoxide dismutase) có chứa một ion Fe^{3+} trong cộng tố.

Cu,Zn-SOD và Mn-SOD được tìm thấy trong tế bào có nhân của sinh vật hiếu khí. Cu,Zn-SOD tồn tại trong nguyên sinh chất, trong gian bào của tế bào động vật bậc cao. Mn-SOD có thể được tìm thấy trong mitochondria của tế bào động vật bậc cao. Mn-SOD và Fe-SOD đã được phát hiện tồn tại trong nguyên sinh chất của tế bào không nhân. Riêng Fe-SOD còn được phát hiện tồn tại trong nguyên sinh chất của tế bào sinh vật yếm khí.

SOD đã được phát hiện tồn tại trong tế bào của các loài vi sinh vật, thực vật nhất là các cây họ đậu, tế bào của các loài tảo như tảo đỏ, trong hồng huyết cầu và trong tế bào nội tạng của động vật như não tim gan (hình 1).



Hình 1: Sự phân bố các loại SOD trong tế bào sinh vật

III ĐẶC TÍNH CỦA SOD

Bảng 1: Một số đặc tính của SOD

Đặc tính	Cu, Zn- SOD	Mn- SOD	Fe- SOD
Trọng lượng phân tử	32.000 135.000 đối với Cu,Zn-SOD của gian bào	~ 42.000, ~ 85.000	~ 42.000, ~ 85.000
Cấu trúc sợi protein và trọng lượng phân tử	α_2 (16.000)	α_2 hay α_1 (~ 21.000)	α_2 hay α_1 (~ 21.000)
Số đơn vị hoạt tính/ mg enzym	~ 3.800	~ 3.000	~3.000
Chất vô hoạt enzym	Cyanide, Azide, Halide anions, diethyldithiocar bamate, hydrogen peroxide	Azide	Azide, Fluor, Dithizone, Toluene 3,4- dithizone, hydrogen peroxide

III.1 Một số đặc tính của Cu,Zn-SOD:

- Ion Cu^{2+} giữ vai trò quan trọng trong cơ chế xúc tác trao đổi điện tử của holoenzyme, Zn^{2+} chỉ giữ vai trò phụ trợ cho sự bền vững của apoenzyme.
- Ion Cu^{2+} và Ion Zn^{2+} liên kết một cách chặt chẽ với apoenzyme, và vị trí của chúng độc lập nhau trong holoenzyme, nhưng gần nhau.
- Cả 2 ion Cu^{2+} và Zn^{2+} có thể chuyển đổi vị trí thuận nghịch cho nhau trong holoenzym.
- Ion Cu^{2+} dường như không phản ứng với diethyl-dithio Carbamate, và không bền ở $\text{pH} < 4,5$.
- Cu-Zn-SOD bị mất hoạt tính trong dung dịch cyanide trung tính, ở nhiệt độ phòng do bởi sự mất đi hai ion Cu^{2+} và Zn^{2+} , làm hư hoại enzyme.
- Hàm lượng ion Cu^{2+} bị giảm thấp 90% trong trường hợp Cu,Zn-SOD tiếp xúc với dung dịch EDTA nồng độ 10^{-3}M ở $\text{pH}=3,8$, gây mất hoạt tính enzyme.
- Cu,Zn-SOD có thể được kết tinh trong các dung môi chloroform, ethanol, aceton và nước, nhưng hoạt tính enzyme có thể bị ảnh hưởng.
- Cu-Zn-SOD là một protein không bền, phải được bảo vệ tránh khỏi sự thủy phân của proteases và tác động của nhiệt độ cao.
- Hoạt tính SOD không bị ảnh hưởng đáng kể trong môi trường ure nồng độ 8.0M-9,5 M.
- Apoenzyme thiếu tryptophan.
- Các nhóm thuốc thử đặc trưng như xanh metylen được sử dụng để nhận dạng nhóm amino acid mà thường bị cản trở bởi Cu^{2+} hoặc Zn^{2+} trong holoenzyme. Thuốc thử đặc trưng có thể gây biến tính nhanh chóng apoenzyme nhưng không ảnh hưởng đến holoenzyme. Chỉ một loại acid amin là histidine bị biến đổi bởi nhóm thuốc thử hoạt quang. Một số trường hợp enzyme bị thất hoạt, biến tính hoàn toàn là do sự mất đi 3 gốc histidine trong một sợi xoắn kép.
- Acid diazosulfanilic dễ dàng liên kết với gốc histidine làm biến tính apoenzyme nhưng không ảnh hưởng đến holoenzyme.

III.2 Một số đặc tính riêng của Mn-SOD, Fe-SOD

Mn-SOD bị thất hoạt bởi quang phổ EPR bởi vì tâm hoạt động Mn bị tách ra. Mn-SOD cũng bị thất hoạt bởi chloroform và ethanol, bởi pH acid và

kiềm. Tâm hoạt động xúc tác Mn^{2+} chuyển thành Mn^{3+} và ngược lại trong chu trình xúc tác phản ứng loại trừ O_2^- .

Fe-SOD có thể nhận biết bởi quang phổ EPR, nhưng cũng bị thất hoạt bởi chloroform và ethanol, bởi pH acid và kiềm. Tâm hoạt động xúc tác Fe^{2+} chuyển thành Fe^{3+} và ngược lại trong chu trình xúc tác phản ứng loại trừ O_2^- .

Cả Mn-SOD và Fe-SOD đều không bị thất hoạt bởi cyanide.

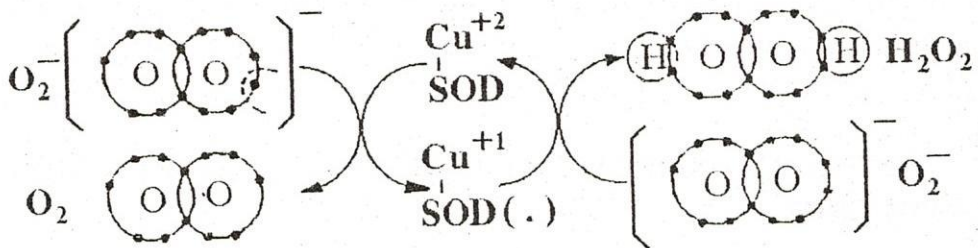
IV CƠ CHẾ XÚC TÁC CỦA SOD

SOD luôn tồn tại trong tế bào sinh vật, là nhân tố quan trọng thực hiện nhiệm vụ xúc tác cho phản ứng oxy hóa khử loại trừ O_2^- . Cơ chế xúc tác cho phản ứng loại trừ O_2^- xảy ra như sau:

SOD



Gốc superoxide O_2^- trao cho ion Cu^{2+} của SOD một electron e^- và trở thành một phân tử oxygen O_2 , khi đó SOD trở thành một gốc tự do hoạt động và lại nhường một e^- tự do cho một gốc hoạt hóa superoxide O_2^- với sự có mặt của hai ion H^+ , tạo ra H_2O_2 (hình 2).



Hình 2: Sơ đồ cơ chế xúc tác của Cu,Zn-SOD

V CƠ CHẤT SUPEROXIDE O_2^- CỦA SOD

Trong cơ thể sống của sinh vật hiếu khí, chu trình oxy hóa khử sinh năng lượng cho cơ thể diễn ra trong tế bào ở điều kiện nhiệt độ thường, gốc điện tử tự do O_2^- , được sinh ra từ O_2 , nhờ xúc tác vận chuyển điện tử của một số

enzyme oxy hóa khử đặc hiệu của chuỗi hô hấp tế bào ở màng trong của ty lạp thể.

V.1 Tính tích cực của O_2^- :

Đối với động vật cấp cao, O_2^- được sinh ra ở liều lượng rất nhỏ dưới sự xúc tác của xanthine oxydase để thực hiện nhiệm vụ tích cực: tiêu diệt các ADN bị tổng hợp sai, các protein có cấu trúc sai lệch hoặc đã lão hóa; và tiêu diệt các vi khuẩn xâm nhập tế bào, thực hiện trách nhiệm loại trừ những thành phần không thích hợp, những thành phần không thể thực hiện đúng được chức năng của mình trong tế bào.

V.2 Tác hại của O_2^- đối với tế bào:

Các kết quả nghiên cứu đã cho thấy O_2^- có tác động trực tiếp đến các mạch protein, lipid, polisaccharide, acid nucleic và những hợp chất sinh học như ADN; O_2^- là nguyên nhân khởi đầu sự phân cắt mạch ADN, acid polisaccharide như acid alginic hoặc hyaluronic thành những gốc tự do, và sự phân cắt vẫn tiếp diễn gây ra sự thoái hóa mạch polime; O_2^- cũng khởi đầu cho phản ứng peroxid hóa chất béo không no cũng như gây nên sự tự oxy hóa của thiol và của epinephrine, bắt đầu cho chuỗi phản ứng oxy hóa cysteine.

O_2^- được xem là nguyên nhân sinh ra sự tổn hại cho tế bào và mô, chính SOD là enzym duy nhất có khả năng xúc tác cho phản ứng loại trừ sự tồn tại của O_2^- , ngăn chặn hiện tượng hư hoại xảy ra trong các tế bào hay các mô của các cơ thể sống cũng như các cơ thể đã ngưng hô hấp. O_2^- dư thừa, ngoài việc làm tổn hại các mô nó sẽ chuyển hóa tạo thành các độc tố khác của oxy là $\cdot OH$ và 1O_2 và H_2O_2 ⁽¹⁾.

VI SUPEROXIDE DISMUTASE LIÊN QUAN ĐẾN MỘT SỐ BỆNH GÂY RA BỞI O_2^-

VI.1 Bệnh xơ cứng phổi

Các loại thuốc trừ sâu trong nông nghiệp, thường có chứa hoạt chất para-dinitro-dimethyl benzydil (PDDB), dư lượng thuốc nằm trên mặt đất, trên cây cỏ của đồng ruộng sẽ theo gió phân tán trong không khí khiến người dân đi lại, sinh sống trong những vùng này dễ dàng bị nhiễm PDDB vào phổi. Chất thuốc trừ sâu PDDB cạnh tranh điện tử với NADPH tạo thành O_2^- dư thừa sẽ gây bệnh xơ cứng phổi. Để loại trừ được lượng O_2^- này thì phải tăng hàm lượng SOD trong cho tế bào phổi.

VI.2 Bệnh Down

Bệnh Down là do cặp nhiễm sắc thể thứ 21 của tế bào bào thai chứa số lượng gen di truyền SOD gấp đôi so với cặp nhiễm sắc thể thứ 21 của tế bào bình thường. Do đó lượng SOD được tổng hợp nên trong tế bào của bào thai này lớn hơn nhiều so với các bào thai bình thường, khiến lượng O_2^- trong tế bào bị chuyển hóa nhanh chóng thành H_2O_2 và tăng cao vượt bình thường trong chu trình hô hấp. Do đó lượng H_2O_2 này gây tổn thương hệ thần kinh vỏ não của thai nhi. Triệu chứng thường thấy ở bệnh Down là chứng tăng bạch cầu.

VI.3 Bệnh tai biến mạch máu não

Do phẫu thuật hoặc một dạng bệnh lý như có những phần tử vật chất phân giải từ ATP tích tụ lại trong huyết quản đã khiến máu không thể lưu thông một cách bình thường. Khi đó hàm lượng O_2^- trong tế bào giảm xuống đột ngột do tế bào không được cung cấp đầy đủ O_2 , để tạo lại sự cân bằng thì xanthinedehydrogenase (XHD) là sẽ biến đổi thành xanthine oxidase để tăng cường xúc tác phản ứng tạo O_2^- từ cơ chất hypoxanthine. đến khi máu lưu thông trở lại thì O_2 , hypoxanthine, XDH, XOD, cùng tồn tại tạo ra một lượng thừa O_2^- không thể được chuyển hóa kịp thời bởi SOD. Do đó sinh ra $\cdot OH$ gây tổn hại tim mạch.

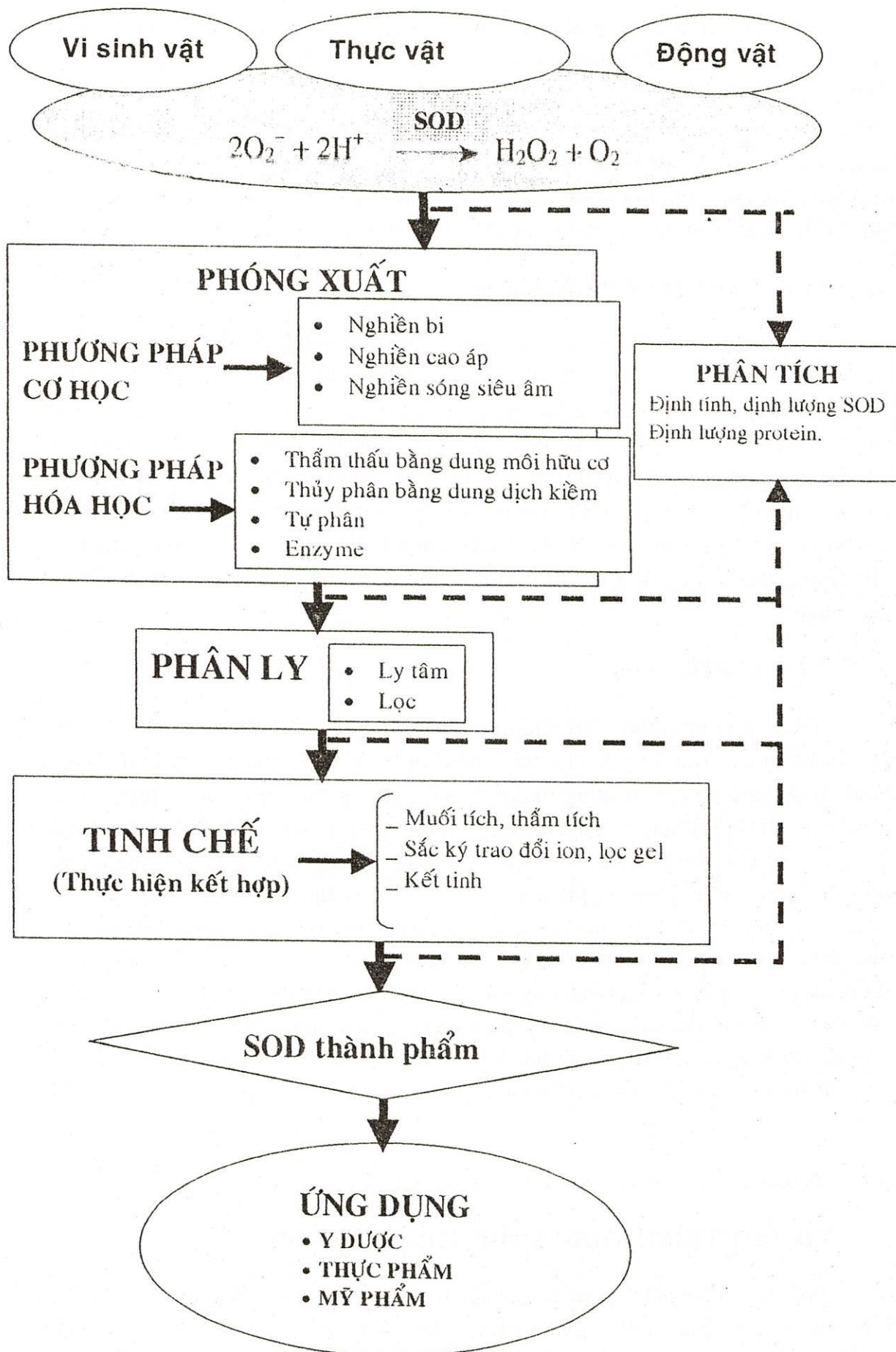
VI.4 Bệnh ung thư

Trong cơ thể người bình thường, những phần tử lạ được tổng hợp từ gene gây bệnh ung thư đều bị ức chế tiêu diệt bởi O_2^- , do đó mầm mống ung thư tự hoại. Khi gene này hoạt động mạnh thì O_2^- không thể làm tròn nhiệm vụ mà còn bị ức chế bởi lượng lớn phần tử lạ được tổng hợp. Nếu gene gây ung thư đã kết gắn với mạch ADN thì phát sinh bệnh ung thư, hoạt tính SOD trong tế bào ung thư giảm thấp. Phương pháp phóng xạ và hóa dược được sử dụng điều trị bệnh ung thư, tạo các gốc hóa trị tự do có khả năng gây tổn thương hư hoại hầu như toàn bộ các phân tử ADN, gây chết tế bào ung thư. Xạ trị mang tính cách điều trị tại vùng kiểm soát các ung thư còn khu trú, hạn chế tối đa sự tổn thương cho các vùng mô lân cận, trong khi phương pháp hóa dược điều trị thường có thể gây tổn thương cho nhiều vùng mô lành khác. Vì vậy mà SOD được đưa vào tế bào để bảo vệ các mô lành chống lại tổn thương bởi phương pháp dược trị ung thư.

Ngoài ra còn rất nhiều bệnh có liên quan đến SOD.

VII QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ THU NHẬN SOD

Để thu nhận SOD, giai đoạn đầu tiên là phá vỡ tế bào, trích chiết dịch bào, trong giai đoạn này cần bảo tồn được hoạt tính enzyme. Nhiều phương pháp trích chiết có thể được áp dụng như phương pháp cơ học, phương pháp hóa học và phương pháp kết hợp của cơ và hóa học. Giai đoạn phân ly kế tiếp



Hình 3: Sơ đồ quy trình công nghệ thu nhận SOD

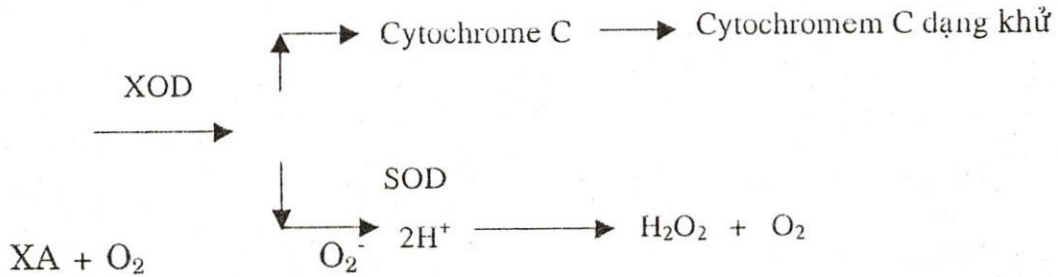
nhằm tách dịch bào khỏi bã tế bào vẫn trong điều kiện bảo đảm hoạt tính enzyme, có thể áp dụng phương pháp lọc qua màng siêu lọc hoặc phương pháp ly tâm. Giai đoạn tinh chế thường được thực hiện bởi sự kết hợp của nhiều phương pháp hóa lý: muối tích bằng sunfate amonium, rửa giải, sắc ký nhiều giai đoạn, kết tinh, đông khô, cô đặc chân không hoặc sấy. Tùy theo yêu cầu của ngành sử dụng mà enzyme được tinh chế ở nhiều mức độ khác nhau.

VIII PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG HOẠT TÍNH SOD [2,3,4,5]

Phương pháp phân tích định lượng hoạt tính SOD dựa trên nguyên tắc đo độ hấp thu quang phổ của chất bị khử ở thời điểm cuối của phản ứng oxy hóa khử O_2^- với cytochrome C hoặc nitro blue tetrazolium với phản ứng cạnh tranh của ion hydro được xúc tác bởi SOD.

VIII.1 Phương pháp Cytochrome C (ppC):

Nguyên tắc:



Một hàm lượng xác định của superoxit O_2^- được sinh ra do phản ứng của cơ chất xanthine (XA) với O_2 dưới xúc tác của enzym xanthinoxidaza (XOD), sẽ là cơ chất đặc trưng của hai phản ứng oxy hóa bởi cytochrome C và bởi ion H^+ dưới xúc tác của SOD, cạnh tranh nhau. Hàm lượng cytochrome bị khử sinh ra được đo ở bước sóng 550nm bởi máy hấp thu quang phổ (spectrophotometer), và hoạt tính SOD được tính theo công thức sau:

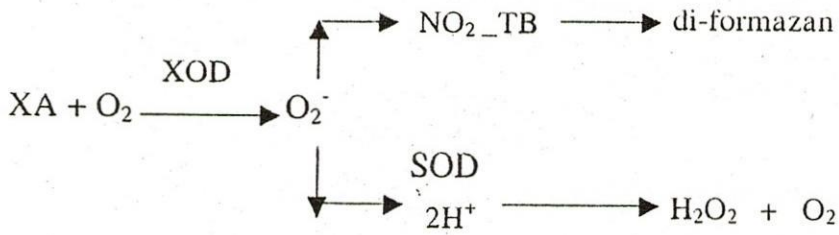
$$\text{Hoạt tính SOD (U/ml)} = \left(\frac{\Delta OD_{\text{blank(m)}}}{\Delta OD_{\text{test}}} - 1 \right) \frac{1}{V_s} \times df$$

V_s = thể tích mẫu đem phân tích.

df = hệ số pha loãng.

VIII.2 Phương pháp NBT (ppN)

Nguyên tắc:



Phương pháp NBT được thực hiện trên cùng nguyên tắc với phương pháp cytochrome C nhưng thay thế cytochrome C bởi chất nitro blue tetrazolium (NO₂-TB), di-formazan sinh ra được đo ở bước sóng 560nm và tỉ hoạt tính SOD được tính theo công thức:

$$\text{Tỉ Hoạt tính SOD (\%)} = \frac{\Delta\text{OD}_{\text{blank}} - \Delta\text{OD}_{\text{test}}}{\Delta\text{OD}_{\text{blank}}} \times 100$$

$$\Delta\text{OD}_{\text{blank}} = E_{\text{bl}} - E_{\text{bl-bl}}$$

$$\Delta\text{OD}_{\text{test}} = E_{\text{s}} - E_{\text{s-}}$$

ppN là phương pháp đo cho kết quả gián tiếp phải dựa vào đường chuẩn để tính ra giá trị hoạt tính, đường chuẩn được dựng từ SOD thuần khiết.

IX KẾT LUẬN

SOD tồn tại trong tế bào sống của mọi loài sinh vật hiếu khí, là enzyme duy nhất có khả năng giải độc cho tế bào khỏi sự lão hóa hư hoại bởi hoạt động của các gốc điện tử tự do của oxy. Thế nhưng nhiệm vụ tích cực của SOD và bản thân enzyme này chỉ được phát hiện và nghiên cứu từ nửa sau thế kỷ 20. Sự phát triển của các công trình nghiên cứu SOD đã đem lại nhiều giải đáp quan trọng cho Y học hiện đại. Trong tương lai, SOD sẽ tiến vào nhiều lãnh vực khác nhằm mục tiêu bảo vệ sức khỏe con người. Đối với Việt Nam chúng ta, Y học và các ngành công nghệ enzyme, công nghệ sinh học, công nghệ thực phẩm cần quan tâm nghiên cứu và ứng dụng enzyme SOD để nhằm bảo vệ sức khỏe người dân một cách hữu hiệu.

REVIEW OF SUPEROXIDE DISMUTASE

Dong Thi Anh Dao - Nguyen Duc Luong - Le Van Nhung
Yumi Yoshikawa - Kanji Matsumoto

ABSTRACT : Superoxide dismutase EC 1.15.1.1 (SOD) is a metalloenzyme which catalyzes the disproportionation of superoxide radicals (O_2^-) to molecular oxygen and H_2O_2 . Superoxide dismutases have been discovered by Joe McCord and Irwin Fridovich in 1968; SOD have been found in almost aerobic and anaerobic bacteria, fungi, prokaryotic and eukaryotic algae, plants and vertebrates. SOD plays an important role in protecting cells against oxygen toxicity. Three types of SOD have been found and they are distinguished by different metals in their catalytic center. Superoxide dismutase and superoxide radical have relations with various human diseases.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Môn Sinh Hóa, *Hóa Sinh Y Học*, ĐH Y Dược TpHCM, 1998.
- [2] Hiệp Hội Quốc Tế Chống Ung Thư, *Ung Thư Học Lâm Sàng*, NXB Y Học, 1991.
- [3] Harold A. Harper, *Physiological Chemistry*, 13th Edition, Lange Medical Publication, 1971.
- [4] H. Schotte, K.H. Kroner, H. Hustedt and M.R. Kula, *Enzyme Microb. Technol.*, **5**, 143-148 (March 1983).
- [5] I. Takagawara, T. Fujita, Y. Suzuki, J. Yamauchi, K. Fujii, J. Yamashita and T. Horio, *Hatsukou to Kougyou*, (tiếng Nhật) **35**(9), 737-739 (1982).
- [6] Tae Ho Lee and Sang Ok Lee, *Agric. Biol.Chem.*, **52**(6), 1361-1367 (1988).
- [7] A.V. Peskin, Y.M.Koen and I.B. Zbarsky, *FEBS Lett.*, **78**, 41 (1977).
- [8] Y. Ljubljana, *7th European symposium Communication*, June 12-14, 55-77 (1990).
- [9] J.M. McCord and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055 (1969).
- [10] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- [11] K. Matsumoto, S. Ito, H. Ohya and M. Naito, *Huntaikougakukai Shi*, (tiếng Nhật), **26**, 61-66 (1989).

[12] Hassan, H.M., Fridovich, I., *Biol. & Clin. Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1763 (1976)

[13] Y. Yoshikawa, Anh Dao, T. Dong, X. x. Hui, K. Matsumoto, *J. Soc. Powder Technol.*, Japan, **36**, 534-541 (1999).

[14] G. Jadot, A.M. Michelson, K. Puget, *Free Rad. Res. comms.*, **2** (2), 19-56, 1986.