

Kocatepe Vet.J (2013) 6(1): 19-24
DOI: 10.5578/kvj.5467
Kabul Tarihi : 17.05.2013

ARAŞTIRMA MAKALESİ

RESEARCH ARTICLE

Key Words

Doku
Gıda Kısıtlaması
Malondialdehit
Redükte Glutasyon

Anahtar Kelimeler

Tissue
Food Restriction
Malondialdehyde
Reduced Glutathione

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Van - Türkiye

²Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Van – Türkiye

³Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Van - Türkiye

⁴Afyon Kocatepe Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Afyonkarahisar - Türkiye

* Corresponding author

Email: tkahraman@yyu.edu.tr
Telefon: +90 (432) 225 10 24

Gıda Kısıtlamasının Ratlarda Doku Lipid Peroksidasyonu ve Glutasyon Düzeylerine Etkilerinin Araştırılması

Tahir KAHRAMAN^{1*} Ramazan ÜSTÜN² Fahri BAYIROĞLU³ Recep ASLAN⁴

ÖZET

Gıda kısıtlamasının metabolik hızı azaltarak, lipid peroksidasyonu düşürdüğü öne sürülmektedir. Oksijen metabolizmasının bu ara indirgenme ürünlerinin düzeyleri, hücrel savunma mekanizmasını oluşturan antioksidan sistemler ile kontrol edilmektedir. Kısıtlı beslemenin antioksidan savunma sistemini destekleyip güçlendirdiği de bildirilmektedir. Araştırmada 8 hafta süreyle % 50 gıda kısıtlaması uygulanan 6 haftalık erkek Wistar Albino ratların karaciğer, beyin, testis, dalak, kalp ve böbrek dokularında; lipid peroksidasyon ürünü malondialdehid (MDA) ve glutasyon (GSH) düzeylerindeki değişimler incelenmiştir. Gıda kısıtlaması sonrası deneme grubu, doku MDA düzeyinde artış gözlenmesine karşın bu durum istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Deneme grubu GSH düzeylerinde, karaciğer, beyin ve böbreklerde bir miktar azalma olmasına karşın testis dokusunda hafif artış, dalak ve kalp dokusunda herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Kontrol ve deneme grubu GSH düzeyleri, istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). MDA düzeylerinde hafif artışın gözlenmesi, buna karşın GSH düzeylerinde hafif azalmanın tespit edilmesini diyet kısıtlaması sırasında protein alımının yetersizliği ve homeostazisin sağlanması için adaptasyon amacıyla gerçekleştiği düşünülmektedir.

...

The Effects of the Food Restriction on Lipid Peroxidation and Glutathione Levels in Rat Tissues

S U M M A R Y

Food restriction is known to decrease lipid peroxidation by causing reduced metabolic rate. During the oxygen metabolism in the body, lipid peroxidation end-products are generated. It is suggested that food restriction causes the enhancement of the antioxidant system. In this study, the alterations of malondialdehid which is one of the end-products of the lipid peroxidation and glutathione levels in the tissues liver, brain, testis, spleen, heart and kidney of the rats which exposed to the food restriction by 50 % during 8 weeks were investigated. After the restriction period, even though the tissue MDA levels of the experimental group was found to be increased, this was not statistically important ($p>0.05$). As for the GSH levels of the study group, it tended to decrease in the liver, brain and kidneys but slightly increased in the testis tissue while there were no change in the spleen and heart tissues in respect of GSH levels. In spite of these alterations, it was not found statistical importance between the study and the control groups ($p>0.05$). It can be concluded that some adaptational changes such as slight increase in MDA levels and decrease in GSH levels started to take place in response of decreased protein and energy intake. But we think that the period of restriction was not enough to observe the drastical changes in these mentioned parameters in tissue levels.

GİRİŞ

Uzun bir süreden itibaren kemirgenlerde gıda kısıtlaması, nedeni tam olarak bilinmeyen bazı mekanizmalarla yaşam sürelerini artırmaktadır (Masoro 1985; Masoro 1988; Weindruch ve ark 1986; Heydari ve Richardson 1992). Ayrıca gıda kısıtlamasının yaşlanmaya bağlı olarak gelişen fizyolojik fonksiyonlardaki kaybı önlediği ve birçok yaşlanmayla ilgili hastalıkların oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Yu ve ark 1985; Lane ve ark 2001).

Normal hücrel metabolizma aşamasında moleküler oksijenin çoğu suya kadar indirgenir. Küçük kısmı ise reaktif oksijen türlerine dönüşür. Serbest radikal olarak isimlenen bu reaktif oksijen türleri özellikle membranlarda lipid ve lipid moleküllerine saldırarak lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Yaşlanma sürecinin, hücrel metabolik aktivite ile ilişkili olarak ortaya çıkan ve serbest radikal ürünlerinin birikiminden kaynaklandığı iddia edilmiştir (Harman 1992; Cutler 1984).

Gıda kısıtlamasının, metabolik aktiviteyi azaltarak, lipid peroksidasyonunu düşürdüğünü ileri süren araştırmalar yanında, açlık denemelerinde lipid peroksidasyonunun artışı ileri süren araştırmalar da bulunmaktadır (Wohaib ve Godin 1987; Crescenzo 2011; Pieri ve ark 1990; Jung ve Henke 1997).

Hücrel oksijen metabolizması sonrası oluşan serbest radikaller, yine hücrel savunma mekanizmasını oluşturan antioksidan sistemler ile kontrol edilir. Kısıtlı beslemenin antioksidatif savunma sistemini destekleyip güçlendirdiği de bildirilmiştir (Laganieri ve Yu 1987; Yu 1993).

Hücre içi ve hücrelerarası antioksidan ajanlardan glutasyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif zarara karşı korur. Glutasyon aynı zamanda, protein ve DNA sentezi, radikal yıkımı sonrası oluşan hidroperoksitlerin transportu, proteinlerin sülfidril gruplarının devamlılığının sağlanması, hücre ve eritrositlerin serbest radikallerin ve radyasyonun yıkıcı etkilerine karşı korunması, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, ksenobiotiklerin detoksifikasyonu gibi pek çok önemli biyolojik olaylarda rol oynar (Meister 1984; Akkuş 1995; Laganieri ve Yu 1989).

Bu araştırmada, gıda kısıtlaması sonrasında ratların çeşitli dokularında lipid peroksidasyon ürünü malondialdehit ve antioksidan ajan glutasyon düzeylerindeki değişimler araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Deneme Hayvanları ve Diyetler:

Çalışmada, başlangıçta 3 haftalık erkek Wistar Albino ratlar kullanılmıştır. Denemenin yapılacağı laboratuvar ortamına adaptasyon sağlanması için, 6 haftalık yaşa kadar tüm ratlar standart rat yemi ile *ad libitum* beslenmiştir.

Deneme 24-26 °C oda sıcaklığında, nem oranı, %50-60 olan ve aydınlık-karanlık siklusu her biri 12 saat olacak şekilde ayarlanan bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Su, deneme ve kontrol gruplarına kısıtlamaksızın *ad libitum* sağlanmıştır. Deneme ve kontrol yemleri, Van Yem Sanayii A.Ş.'de özel olarak yapılmıştır. Kontrol grubu için standart rat yemi hazırlanırken, deneme grubu için birim miktarda normalden iki kat fazla vitamin ve mineral katkısı içerecek şekilde hazırlanmıştır. Böylece toplam gıda kısıtlaması yapılırken, vitamin ve mineral eksikliğinin oluşmaması sağlanmıştır. Üç haftalık adaptasyon süresi sonunda ratların ağırlıkları her grupta dengeli dağılacak şekilde rastgele, deneme ve kontrol olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Teker teker kafeslere yerleştirilerek kontrol grubundaki hayvanlar *ad libitum* beslenirken, deneme grubundaki hayvanlar ise kontrol grubunun günlük yem tüketiminin yarısı olacak şekilde beslenmeleri sağlanmıştır. Deneme boyunca kontrollerin günlük yem tüketim kayıtları tutularak, deneme grubuna sağlanacak %50 kısıtlamalı miktarlar tespit edilmiştir. Belirlenen miktardaki yemler, 8 hafta süreyle günde bir defada 17.00-18.00 saatleri arasında verilmiştir. Deneme başlangıcında, deneme grubundakilerin yem tüketimi için, bir önceki hafta kendi *ad libitum* tüketimlerinin yarısı esas alınırken, daha sonraları, kontrollerin tüketim miktarına göre belirlenmiştir.

Doku Örneklerinin Alınması ve Analizleri:

Gıda kısıtlaması sonrasında, anestezi altında sıçanların karaciğer, beyin, testis, dalak, kalp ve böbrek dokuları alınarak sıvı azotta dondurulmuş ve Haris derin dondurucuda (-80°C) analiz zamanına kadar saklanmıştır. Dokularda malondialdehid (MDA) analizi, Ohkawa ve ark (1979)'nın metodu ile glutasyon (GSH) analizi ise, Ball (1966) metodu ile yapılmıştır. Gıda kısıtlaması etkisinin dokularda MDA ve GSH düzeylerinin, gruplar arası istatistik değerlendirmeleri varyans analizi (ANOVA) ile SPSS (IBM-PC) paket programında yapılmıştır (Cochran ve Cox 1950; Snedecor ve Cochran 1989; Akgül 1997).

BULGULAR

Gıda kısıtlaması sonrası kontrol ve deneme gruplarının vücut ağırlık değişimleri Tablo 1’de sunulmuştur. Kontrollere kıyasla deneme grubunun vücut ağırlığında istatistiksel olarak belirgin bir

azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). Gıda kısıtlamasına tutulan ratların yem tüketimi ile ilgili bilgiler Tablo 2’de sunulmuştur.

Tablo 1. Gıda kısıtlaması süresince gruplardaki vücut ağırlık değişimleri (g, $X \pm SH$)
Table 1. During the food restriction groups, changes in body weight (g, $X \pm SH$)

Gruplar	N	Başlangıç	2.Hafta	4.Hafta	6.Hafta	8. Hafta
Kontrol	14	125 \pm 4	167 \pm 3	193 \pm 6	221 \pm 5	267 \pm 7
Deneme	14	125 \pm 4	136 \pm 4	141 \pm 5	148 \pm 4	153 \pm 6
P		>0.05	<0.05	<0.05	<0.01	<0.01

Tablo 2. Gıda kısıtlaması süresince gruplardaki yem tüketim miktarları (g, $X \pm SH$)
Table 2. Food restriction during the consumption of food groups (g, $X \pm SH$)

Gruplar	N	Başlangıç	2.Hafta	4.Hafta	6.Hafta	8. Hafta
Kontrol	14	18 \pm 2	19 \pm 2	19 \pm 2	17 \pm 2	18 \pm 2
Deneme	14	18 \pm 2	9.5 \pm 2	9.5 \pm 2	8.5 \pm 2	9 \pm 2

Gıda kısıtlamasının dokulardaki malondialdehit (MDA) düzeyleri üzerine etkileri Tablo 3’te sunulmuştur. Gıda kısıtlaması sonrası

deneme grubu doku MDA düzeyinde, bir miktar artış gözlenmesine karşın bu artış istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 3. Gıda kısıtlamasının dokulardaki malondialdehit (MDA) düzeyleri üzerine etkisi (nmol/g doku, $X \pm SH$)
Table 3. The effect of food restriction on tissue levels of malondialdehit (nmol/g tissue, $X \pm SH$)

Gruplar	N	Karaciğer	Beyin	Testis	Dalak	Kalp	Böbrek
Kontrol	14	142 \pm 5	63.2 \pm 5.8	24.2 \pm 4.9	31.7 \pm 10.6	14.7 \pm 2.1	61.1 \pm 10.0
Deneme	14	151 \pm 4	67.8 \pm 8.7	27.7 \pm 4.7	41.5 \pm 15.5	19.1 \pm 3.3	68.3 \pm 8.4

Aynı sütunda yer alan gruplar arasında istatistiksel önem bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

Gıda kısıtlamasının dokulardaki glutasyon (GSH) düzeyleri üzerine etkileri Tablo 4’de sunulmuştur. Deneme grubu GSH düzeylerinde ise karaciğer, beyin ve böbreklerde sayısal azalma saptanmasına karşın testis dokusunda hafif artış,

dalak ve kalp dokusunda herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Kontrol ve deneme grubu GSH düzeyleri, istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 4. Gıda kısıtlamasının dokulardaki glutasyon (GSH) düzeyleri üzerine etkisi ($\mu\text{mol/g}$ doku, $X \pm SH$)
Table 4. Food restriction effects on glutathione levels in tissues ($\mu\text{mol/g}$ tissue, $X \pm SH$)

Gruplar	N	Karaciğer	Beyin	Testis	Dalak	Kalp	Böbrek
Kontrol	14	4.37 \pm 0.36	0.63 \pm 0.02	3.53 \pm 0.13	2.40 \pm 0.17	1.71 \pm 0.20	1.74 \pm 0.13
Deneme	14	3.39 \pm 0.34	0.53 \pm 0.04	3.92 \pm 0.14	2.42 \pm 0.07	1.85 \pm 0.15	1.53 \pm 0.07

Aynı sütunda yer alan gruplar arasında istatistiksel önem bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

TARTIŞMA

Oksijen radikalleri de dahil olmak üzere bir çok radikaller, yaşlanmada ve diğer hastalıklarda önemli roller oynarlar (Harman 1992; Halliwell ve ark 1992).

Bu teze göre normal metabolik aktivite sırasında üretilen serbest radikaller zamanla vücut içerisinde zararlı etkiler oluşturmakta ve sonuçta fizyolojik aktivitelerde gerileme ve homeostazisin bozulması ile karşı karşıya kalınmakta ve hastalık insidensinde artışa paralel yaşlanma olayı gerçekleşmektedir. Serbest radikaller, normal metabolik aktivite sırasında hücre mitokondrisinde meydana gelmekte oldukları bilindiğinden, gıda kısıtlaması ile bu metabolik aktivitenin yavaşlatılarak serbest radikal oluşumunun daha az indirgenebileceği düşünülmektedir (Yu ve ark 1985; Harman 1992; Yu 1993; Nagai ve ark 2000). Metabolik aktivitenin yavaşlatılmasıyla serbest radikal hasarının azaltılacağı ileri sürülmektedir (Warner 1993; Yu ve ark 1991; Davis ve ark 1979; Rao ve ark 1990; Clipalkatti 1983).

Bu çalışmada 8 hafta süreyle %50 gıda kısıtlamasının dokularda lipid peroksidasyon ürünü malondialdehit (MDA) ve glutasyon (GSH) düzeyleri üzerine ilişkileri araştırılmıştır. Gıda kısıtlaması sonrası dokularda MDA düzeylerinde kısmi artış gözlemlense de bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.005$). Wanagat ve ark (1999), Laganier ve ark (1987), Xia ve ark (1995) ile Koizmiu ve ark (1987) gıda kısıtlaması üzerine yaptıkları çalışmalarda, MDA düzeylerinde azalma; Pieri ve ark (1990) ile Junk ve ark (1997) açlık denemeleri sonrasında; Huang ve ark (1993) protein kısıtlaması uygulamasına bağlı MDA düzeylerinde artış gözlemlenmişlerdir. Çalışmada MDA düzeylerindeki hafif artış bulunması, Pieri ve ark (1990), Junk ve ark (1997) ile Huang ve ark (1993)'nın yaptıkları çalışmalarla uyum göstermektedir.

Bu çalışmada gıda kısıtlaması sonrası doku GSH düzeylerinde azalma saptanmıştır. Bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Bauman ve ark (1988) ile Pelissier ve ark (1993), diet protein içeriklerinin azaltılmasına bağlı olarak doku GSH düzeylerinde azalma bildirmişlerdir. Çalışmada bulunan GSH düzeyi sonuçları, Bauman ve ark (1988), Pelissier ve ark (1993) ile uyum göstermiştir. Bu azalmanın diyet kısıtlaması sırasında protein alımının da kısıtlanmasına bağlı olarak ve homeostazisin sağlanması için adaptasyon amacıyla gerçekleştiği kanaatindeyiz.

SONUÇ

Araştırma bulgularımız doğrultusunda, açlık ve yetersizlik düzeylerine erişmeyen gıda kısıtlamasının oksidatif metabolizmayı strese sokmadığını düşünmekteyiz. Uygulanan ölçütlerde gıda kısıtlaması sonrasında ratlarda serbest radikal hasarın artmadığı, kısa sürede metabolizmada homeostazisin sağlandığı gözlenmiştir. Gıda kısıtlaması çalışmalarında, olumlu etkilerin açıklanmasında hücre metabolik aktivitenin yavaşlatılması önemli yer tutmaktadır. Araştırmamızda diyet miktarında % 50 kısıtlamaya gidilmesi, vitamin ve mineral düzeylerinin *ad libidum* beslenmeye tabi tutulan deney hayvanlarıyla aynı miktarlarda yer almasının, lipid peroksidasyon ürünü, doku MDA ve antioksidan GSH düzeylerinde elde edilen bilgiler doğrultusunda, insanlarda sağlıklı yaşamın sürdürülmesi, sağlıklı beslenme ve zayıflama amacıyla diyet oluşturulması çalışmaları üzerine yapılacak araştırmalarda önemli yol gösterici bilgilere kaynak oluşturacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Akgül A. 1997.** Tıbbi Araştırmalarda İstatistiksel Analiz Teknikleri SPSS Uygulamaları, Yüksek Öğretim Kurulu Matbaası, Ankara.
- Akkuş I. 1995.** Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri Mimoza Yayınları. Konya.
- Ball CR. 1966.** Estimation and identification of thiols in rat spleen after cysteine or glutathione treatment, Pelevance to Protection Against Nitrojen Mustards, Biochemical Pharmacology, 15, 809 - 816. Pergamon Press Lmd.
- Bauman PF, Smih TK and Bray TM. 1988.** The effect of dietary protein and sulfur amino acids on hepatic glutathione cöcentration and glutathione-dependent enzym activities in the rat. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 66:1048-1052.
- Chipalkatti S, De AK, Aiyar AS. 1983.** Effect of diet restriction on some biochemical parameters related to aging in mice, Journal of Nutrition, 113:944-950.
- Cochran WG and Cox GM. 1950.** Experimental Desing, 2.Ed. John Wiley & Jons, New York, USA.
- Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Coppola P, Dulloo AG, Liverini G, Iossa S. 2011.** Mitochondrial energetics in liver and skeletal muscle after energy restriction in young rats.

- British Journal of Nutrition, 2012, 108 (4): 655-65.
- Davis LJ, Todolini B, Biagi PI, Walford RL, Rutter WD. 1979.** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. *Biochemistry* 18: 5294-5299.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross EC. 1992.** Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? Review Article. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 119(6):598-620.
- Harman D. 1992.** Free Radical Theory of Aging ;History In: *Free Radicals and Aging* (Emerit, I, and B., eds). pp.1-10. Khauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Heydari AR, Richardson A. 1992.** Does gene expression play and role in the mechanism of the antiaging effect of dietary restriction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 663:384-395.
- Huang CH and Fwu ML. 1993.** Degree of protein deficiency effects the extent of the depression of the antioxidative enzyme activities and the enhancement of tissue lipid peroxidation in rats. *Journal of Nutrition*, 123: 803-810.
- Jung K, Henke W. 1997.** Effect of starvation of antioxidant enzymes and respiratory mitochondrial functions in kidney and liver from rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 22:163-169.
- Koizumi A, Weindruch R, Walford RL. 1987.** Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. *Journal of Nutrition*, 117:361-367.
- Laganieri S, and Yu BP. 1989.** Effect of chronic food restriction in ageing rats. II. Liver cytosolic antioxidants and related enzymes, *Mechanism of Ageing and Development*, 48: 221-230.
- Laganieri S, Yu BP. 1987.** Anti-lipoperoxidation action of food restriction. *Biotechnical and Biophysical Research Communications*. 145(3):1185-1191.
- Lane MA, Black A, Handy A, Tilmont EM, Ingram DK, Roth GS. 2001.** Caloric restriction in primates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928: 287-95.
- Masoro EJ. 1985.** Nutrition and aging. A current assessment. *Journal of Nutrition*, 115:842-848.
- Masoro EJ. 1988.** Food restriction in rodents: an evaluation of its role in the study on aging. *The Journal of Gerontology*, 43:B59-B64.
- Meister A. 1984.** New aspects of glutathione biochemistry and transport-selective alteration of glutathione metabolism. *Nutrition Reviews*, 42: 397-410.
- Nagai M, Takahashi R, Goto S. 2000.** Dietary restriction initiated late in life can reduce mitochondrial protein carbonyls in rat livers: Western blot studies. *Biogerontology*; 1(4): 321-8.
- Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K. 1979.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry*, 95: 351 - 358.
- Pelissier MA, Darmon N, Desjeux JF and Albrecht R. 1993.** Effects of protein deficiency on lipid peroxidation in the small intestine and liver of rats. *Food and Chemical Toxicology*, 31: 59-62.
- Pieri C, Falasca M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F, Loppo C, Masmocchoni F. 1990.** Antioxidant enzymes in erythrocytes from old and diet restricted rats. *Boll. Soc. Italiana di Biologia Sperimentale*, 10-909-914.
- Rao G, Xia E, Nadakavukaren MJ, Richardson A. 1990.** Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in the rat liver. *Journal of Nutrition*, 120: 602-609.
- Snedecor G, Cochran, WG. 1989.** *Statistical Methods*, Iowa State University, Press Ames, pp. 1 - 503, USA.
- Wanagat J, Allison DB, Weindruch R. 1999.** Caloric intake and aging: mechanisms in rodents and a study in nonhuman primates. *Toxicological Sciences*., 52(2 Suppl): 35-40.
- Warner HR. 1993.** Overview, mechanisms of antioxidant action on life span. *Toxicology and Industrial Health*, 9(1-2): 151-161.
- Wohaib SA, Godin DV. 1987.** Starvation-related alterations in free radical tissue defence mechanisms in rats. *Diabetes*, 36: 169-173.
- Xia E, Rao G, Remmen HV, Heydari AR, Richardson A. 1995.** Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. *Journal of Nutrition*, 125:195-201.
- Yu BP, Masoro EJ, McMahan CA. 1985.** Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical metabolic and longevity

characteristics. The Journals of Gerontology, 40: 657-670.

Yu BP. (1993) Antioxidant action of dietary restriction in the aging process. Journal of Nutritional Science Vitaminology, 39:S75-S83.

Yu BP, Lee DW, Dhoi JH. 1991. Prevention of free radical damage by food restriction. In: Biological Effects of Dietary Restriction (Fishbain,L.ed.) pp.191-197. Springer-Verlag, New York.