

Sıçanlarda Kalori Kısıtlamasının Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzimlere Etkisi

Effect of Calorie Restriction on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Rats

Duygu Kumbul Doğuç¹, Nigar Yılmaz², Hüseyin Vural³, Yusuf Kara⁴

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, Isparta

² Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, Muğla

³ Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, İzmir

⁴ Burdur Devlet Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı, Burdur

Özet

Amaç: İnsanlarda ve diğer canlı türlerinde vücut homeostazını bozmadan, esansiyel besin gereksinimi sürdürülürken alınan kalorinin azaltılmasına kalori kısıtlaması denir. Kalori kısıtlanmasının, obeziteyi önlemenin yanısıra yaşlanmanın gecikmesi ve yaşlanmaya bağlı çeşitli patolojilerin önlenmesi gibi etkilerinin olduğu görülmüştür. Bu çalışmada 10 hafta süreyle alınan kalorinin %60 oranında azaltılması şeklinde kalori kısıtlaması uygulanmış ve diet uygulamasının oksidan ve antioksidan belirteçler üzerine etkisi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Wistar Albino cinsi, 40 adet, 4-5 aylık, erkek sıçan kullanılmıştır. Normal kilolu kontrol (NK, n=10), normal kilolu kalori kısıtlaması yapılan (ND, n=10), obez kontrol (OK, n=10), obez kalori kısıtlaması yapılan (OD, n=10) gruplar şeklinde 4 grup oluşturulmuştur. Deneysel başlangıcında normal kilolu grup (NK) 250±20 gr, obez grup (OK) 400±20 gr idi. 10. haftanın sonunda, anestezi altında aorttan kan alınarak deney sonlandırılmıştır. Numunelerden hemolizat hazırlanarak lipid peroksidasyon ürünü MDA, antioksidan enzimler; SOD, KAT ve GSH çalışılmıştır. Bulgular: OD grubu MDA düzeyi, OK grubuna göre anlamlı düzeyde düşük iken, SOD, CAT ve GSH düzeyleri OD grubunda OK grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir (P<0.01). NK grubuna göre ND grubunda MDA düzeyi anlamlı düzeyde düşük ve SOD, KAT düzeyleri anlamlı düzede yüksek saptanmıştır (P<0.01). Sonuç: Kalori kısıtlaması lipid peroksidasyonunu azaltırken antioksidan enzim tüketimini de azaltmaktadır. Kalori kısıtlaması serbest radikallerin oluşumunu azaltabilmektedir dolayısıyla etyolojisinde serbest radikallerin rol oynadığı birçok hastalığa ve yaşlanma sürecindeki olumsuzluklara karşı kalori kısıtlaması koruyucu bir önlem olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Obezite, kalori kısıtlaması, oksidatif stres; antioksidan enzimler

Abstract

Objective: Caloric restriction (CR) is a dietary regimen that restricts calorie intake while maintaining the essential nutritional requirements without disturbing the homeostasis of body. As well as prevention of obesity, CR has been shown to prevent age-related pathologies and delay the aging process. In the present study 60% of caloric intake was restricted for 10 weeks and effect of CR on oxidant and antioxidant markers were determined from their erythrocytes.

Materials and Methods: Wistar Albino, 40 male (4-5 months) rats were included and divided into 4 groups as: non-obese (NK), non-obese caloric restricted (ND), obese (OK), obese caloric restricted (OD) groups. At the beginning of the experiment the weight of NK and OK groups were 250±20 gr and 400±20 gr respectively. At the end of 10th week the rats were anaesthetized, euthanized by taking blood from aorta. Hemolyzed erythrocytes were prepared and malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and finally reduced glutathione (GSH) were determined. Results: While MDA level of OD group was significantly decreased, SOD, CAT and GSH levels of OD group was significantly increased compared to OK group. For ND group, MDA level was significantly decreased and SOD and CAT levels were significantly increased compared to NK group (P<0.01). Conclusion: CR seems to lower lipid peroxidation and simultaneously decrease antioxidant enzyme consumption. As CR may lower the occurrence of free radicals, it may be a protective measure against many diseases in which free radicals take place as an etiological factor and against negative processes in ageing.

Keywords: Obesity, calorie restriction, oxidative stress; antioxidant enzymes

Başvuru Tarihi: 03.07.2012 **Kabul Tarihi:** 01.08.2012

Application: 03.07.2012 **Accepted:** 01.08.2012

Giriş

Enerji alınması ve harcanması arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanan ve ihtiyaç fazlası kaloringin organizmada depolanması sonucu meydana gelen obezitenin etyolojisinde daha çok yüksek kalorili diyet ile beslenmek ve/veya hareket azlığı gibi çevresel faktörler rol oynamaktadır¹. Gelişmiş toplumlarda hızla artan obezite oranı insan vücudundaki sistemlerin bir çoğunu olumsuz yönde etkilemektedir.^{2,3,4} İnsanlarda ve diğer canlı türlerinde vücut homeostazını bozmadan alınan kalori miktarı azaltılabilmektedir. Kalori kısıtlamasının birçok hastalığa (ateroskleroz, hipertansiyon, diabetes mellitus vs) karşı koruyucu etkisi olduğu, bunun yanısıra yaşlanmanın gecikmesi ve canlı organizmalarda yaşam süresinin uzaması şeklindeki etkileri ortaya konmuştur.^{1,2,5,6,7} Kalori kısıtlamasının sağlamakta olduğu bu olumlu etkilerin altında yatan mekanizma çok açık olmasa da bu konuda birçok hipotez ortaya konmuştur. Bunlardan biri de kalori kısıtlaması ile serbest radikallerin yol açtığı hasarların azaltılması yoluyla olumlu etkilerin sağlandığı yönündedir.³ Bu çalışmada 10 hafta süreyle, esansiyel besin gereksinimi sürdürülürken alınan kaloringin % 60 oranında azaltılması ile sıçanlara kalori kısıtlaması uygulanmış^{4,8} ve eritrositlerde lipid peroksidasyon ürünü malondialdehid (MDA) ve antioksidan enzimlerden süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (KAT) enzim aktiviteleri ve redükte glutatyon (GSH) düzeyleri incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Çalışma Grubu

Çalışmamızda kullanılan sıçanlar Süleyman Demirel Üniversitesi, Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir ve kullanılan sıçanlara 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' (www.nap.edu/catalog/5140.html) prensipleri doğrultusunda uygulama yapılmış, hayvan hakları korunmuş ve Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (SDU-HADYEK) onay alınmıştır.

Çalışmamızda Wistar Albino cinsi, 40 adet, 4-5 aylık, yetişkin erkek sıçan kullanılmıştır. Normal kilolu kontrol (NK, n=10), normal kilolu kalori kısıtlaması yapılan (ND,

n=10), obez kontrol (OK, n=10), obez kalori kısıtlaması yapılan grup (OD, n=10) şeklinde 4 grup oluşturulmuştur. Sıçanların herbiri ayrı kafeslere konmuştur. Deney başlangıcında normal kilolu grup 250±20 gr, obez grup 400±20 gr idi. Sıçanlar deney süresince standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı (25°C) koşullarında tutulmuşlardır. Kontrol grupları yeteri kadar su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) ile beslenmişlerdir. Kalori kısıtlaması yapılan gruplar ise yeteri kadar su ve günlük alması gereken yemin %60 kadarı kısıtlanarak beslenmişlerdir. Sıçanların kiloları haftalık ölçülmüştür. Sıçanlar, 10. haftanın sonunda aynı gün içerisinde, intramuskuler olarak uygulanan %10'luk ketamin-%2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV) anestezisi altında aortadan kan alınarak sakrifiye edilmişlerdir. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri 4000 devir/dk ile 5 dk. santrifüj edilmiş ve plazması uzaklaştırılmıştır. Eritrositler 3 mL %0.9 NaCl ile 4000 devir/dk olacak şekilde 5 dk santrifüj edilerek 3 defa yıkandıktan sonra supernatantları atılmış, eritrositler 2 mL soğuk distile su ile hemoliz edilmiştir. Hemoglobin konsantrasyonu siyanomethemoglobin metoduyla hemolizattan tayin edilmiştir.⁹

Malondialdehid (MDA) Düzeyinin Saptanması

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehid (MDA) ölçümü için Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi kullanılmıştır.¹⁰ Metodun prensibi TCA ile çöktürme işleminden sonra MDA-TBA (Tiobarbitürik asit) kompleksinin 532 nm'de (Shimadzu UV-1601, Almanya) verdiği absorbansın ölçülmesi esasına dayanır. Sonuçlar nmol/gr. Hb olarak verilmiştir.

Superoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Saptanması

SOD aktivitesi, Olympus AU 2700 (Japonya) otoanalizörüne apliance Randox marka ticari kit kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile ölçülmüştür. Ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyonla ksantinden ürik asit ve süperoksit radikali oluşur. Oluşan süperoksit radikali kırmızı renkli formazon bileşiği oluşturmak üzere INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5 phenil tetrazolium chloride ile reaksiyona girer. SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür.¹¹ SOD aktivitesi U/gr Hb şeklinde ifade edilmiştir.

Katalaz (KAT) Aktivitesinin Saptanması

KAT aktivitesi Aebi yöntemine göre çalışılmıştır. KAT hidrojen peroksidin (H₂O₂) su ve moleküler oksijen vermek üzere bozunmasını katalizler. Çalışmada KAT aktivitesi, H₂O₂ konsantrasyonunda birim zamandaki azalmanın 240 nm'de spektrofotometrik olarak (Shimadzu UV-1601, Almanya) izlenmesiyle tayin edilmiştir.¹² KAT aktivitesi U/ gr Hb olarak verilmiştir.

Glutatyon Düzeyinin Saptanması (GSH)

GSH konsantrasyonu, Beutler ve arkadaşları tarafından tanımlanan spektrofotometrik redükte glutatyon ölçüm metoduna göre hemolizattan 2 ml alıp içerisinde glasi-el metafosforik asit, disodyum EDTA ve sodyum klorid bulunan 3 ml presipite edici solüsyonla karıştırıldı ve 5 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldıktan sonra filtre kağıdı ile süzüldü. Filtrat disodyumfosfat solüsyonu ile karşılaştırıldı ve 412 nm'de reaktif körüne karşı absorbansı (Shimadzu UV-1601, Almanya) okundu. Daha sonra küvete 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) solüsyonundan eklenip karıştırıldı ve tekrar absorbansı okundu. Her bir örneğin DTNB eklendikten sonra elde edilen absorbans değerinden ilk okunan absorbans değeri çıkarılarak elde edilen optik dansite farkı redükte glutatyon standardının optik dansite farkı ile karşılaştırılarak redükte glutatyon konsantrasyonları µmol/ gr Hb olarak hesaplandı.¹³

İstatistiksel Analiz:

İstatistiksel değerlendirmeler "SPSS 15.0 for Windows" paket programı kullanılarak yapılmıştır. Deney süresince her bir grubun kilo değişimleri Wilcoxon Sign test ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar için Krukall Wallis testi kullanılmış ve P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir. Anlamlı çıkan veriler için hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi uygulanmıştır ve bu kez P<0.01 anlamlı kabul edilmiştir.

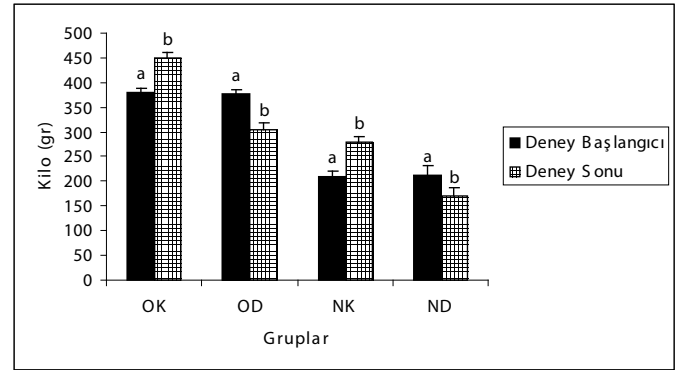
Bulgular

Deney sürecinde (10 hafta) sıçanlar her haftanın ilk günü tartılmıştır. Tüm grupların ilk kiloları ve son kiloları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler saptanmıştır

(p<0.05) (Grafik 1).

Grafik 1:

Sıçanların deney başlangıcı ve sonunda kilo değişimleri



Grafik 1: Sıçanların deney başlangıcı ve sonunda kilo değişimleri

Her bir grubun çalışma başlangıcı ve sonundaki kilo değişimleri Wilcoxon Sign test ile değerlendirilmiştir. 'a' verisi 'b' ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu ifade etmektedir (p<0.05). 10 haftalık kalori kısıtlamasının ardından tüm gruplarda başlangıç kiloları ve deney sonu kiloları arasında anlamlı bir fark saptanmıştır ve bu veriler metodolojinin işlediğini göstermektedir.

Tablo 1:

Tüm grupların lipid peroksidasyon, GSH ve antioksidan enzim sonuçları:

Gruplar	MDA (µmol/gHb)	SOD (U/gHb)	KAT (U/gHb)	GSH (nmol/g Hb)
NK (n=9)	0,320±0,026 a	12136±361a	127±23,38a	88,74±6,22a
ND (n=10)	0,138±0,013b	14531±640b	244±50,57b	110,18±8,35
	MDA (µmol/gHb)	SOD (U/gHb)	KAT (U/gHb)	GSH (nmol/g Hb)
OK (n=10)	0,750±0,069c,x	7716±406c,x	62,02±4,5c,x	51,13±3,05c,x
OD (n=10)	0,476±0,032y	9995±449d,y	99,4±5,7d,y	72,44±2,57y

Tablo 1: Tüm grupların lipid peroksidasyon, GSH ve antioksidan enzim sonuçları

Veriler Kruskall Wallis ve post hoc olarak Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U test ile değerlendirilmiştir ve p<0.01 anlamlı kabul edilmiştir. 'a' verisi 'b', 'c' ve 'd' ile karşılaştırıldığında ve ek olarak 'x' verisi 'y' ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmıştır. Veriler median±SEM olarak verilmiştir.

Oksidatif stres ve antioksidan belirteçler açısından NK grubu ile OK grubu karşılaştırıldığında tüm parametreler

açısından anlamlı bir fark söz konusudur. OK grubunda antioksidan enzimler ve GSH anlamlı düzeyde düşük iken MDA düzeyi anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ($P<0.01$). OK ile OD grubu karşılaştırıldığında ise tüm parametrelerde anlamlı farklılık saptanmıştır ($P<0.01$). OD grubu ile OK karşılaştırıldığında MDA düzeyi anlamlı düzeyde düşük iken, SOD, KAT ve GSH düzeyleri anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. NK grubu ile ND grubu karşılaştırıldığında ise MDA düzeyi ND grubunda NK grubuna göre anlamlı düzeyde düşük iken SOD ve KAT düzeyleri anlamlı derecede yüksek saptanmıştır ($P<0.01$). Ancak normal kilolu sıçanlar ile diet uygulananlar arasında GSH düzeylerinde anlamlı bir fark saptanmamıştır ($P>0.01$) (Tablo 1).

Tartışma

Obezitenin artmakta olan toplumsal bir sorun olması ve birçok sistemik hastalıkla beraberliği aşikardır.² Obezite ve yaşlanma süreci arasında kompleks bir ilişki olduğu, obezitenin metabolik sendromun komponentlerinden biridir ve insülin resistansı, kardiovasküler hastalıklar, hipertansiyon ve kronik böbrek hastalıkları gibi yaşlanma ile görülme sıklığı artan hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir.^{3,4,14,15,16} Vücutta oksidan ürünler ve antioksidan sistem belli bir denge içindedir. Bu denge çeşitli nedenlerle örneğin yaşlanma sürecinde veya bazı sistemik hastalıklarda oksidan ürünlerin artışı yönünde değişmekte ve birçok hastalığın etyopatogenezinde rol oynamaktadır.¹⁷ Biz çalışmamızda obez ve normal kilolu sıçanlara 10 haftalık bir diet uygulamasının ardından kan MDA, SOD, KAT ve GSH düzeylerini saptayarak dietin oksidatif durum üzerine etkilerini araştırdık. Esansiyel vitamin ve mineral gereksinimi karşılanarak, %60 kalori kısıtlaması şeklinde uygulanan diet sonucunda sıçanlarda lipid peroksidasyon ürünü, MDA anlamlı düzeyde düşerken eritrosit antioksidan sistem enzimleri SOD, CAT ve GSH düzeylerinde anlamlı bir artış saptanmıştır. On haftalık diet sonucunda obez sıçanların MDA ve GSH düzeyleri diet sonrasında normal kilolu sıçanların düzeyine yaklaşmış, deney başlangıcındaki anlamlı fark ortadan kalkmıştır. Obez sıçanlara uygulanan diet oksidatif stres parametresini düşürmüş ve normal kilolu sıçanlara uygulanan diet ile bu düşme eğilimi devam etmiştir. Antioksidan belirteçler açısından

bakıldığında da dietin hem obez grupta hem de normal kilolu grupta olumlu sonuçları gözlenmiş ve düzeyleri diet uygulaması sonunda artış göstermiştir. Obezitenin oksidatif stresi dolayısıyla MDA düzeylerini arttırması sonucu antioksidan enzimlerin hızla tüketilmesi mümkündür. Diet süreci boyunca MDA düzeyinin düşüşü ile de antioksidan enzimlerin düzeyini koruması muhtemeldir. Bu çalışmada obezite ve dietin eritrosit oksidan ve antioksidan durumu hakkında bilgi sağlanmıştır. Obezitenin etkilerinin sistemik olması, yaşlanma süreci ve pek çok sistemik hastalıkla ilişkilendirilmesinden dolayı literatürde kan düzeyinde değil fakat farklı dokular üzerine etkileriyle ilgili birçok çalışma vardır.

Silver ve ark.nın yaptığı klinik çalışmada obez vakalarda artmakta olan yağ dokusu ile NADPH oksidaz-p47 phox adlı oksidan enzim ekspresyonunda artış olduğu ve bunun ile ilişkili olarak vasküler endotelial oksidatif streste artış olduğu saptanmıştır.¹⁸ Masoro ve ark.ları kalori kısıtlaması ile lipidler, proteinler ve DNA'da yaş ile ilişkili oksidatif hasar birikiminin azaltılmasının sağlandığını ileri sürmüşlerdir. Mitokondrial membranlardaki lipid açıl zincirlerinin çift bağlarını kaybettiğini ve böylece membran lipidlerinin peroksidasyon olayına karşı daha dirençli hale gelebildiğini ve bunun da diet ile oksidatif hasarın hafifletilmesi hipotezini desteklediğini savunmuşlardır.¹⁹ Bir diğer çalışmada, streptozotosin ile diabet oluşturulan sıçanlarda kalori kısıtlaması yapılmış ve beyin dokusunda SOD, KAT enzim aktivitelerinin arttığı ve oksidatif stres parametrelerinde anlamlı bir düşüş olduğu saptanmıştır.²⁰ Malnütrisyon yaratmadan orta derecede kalori kısıtlamanın reaktif O₂ radikalleri gibi intrinsik hasar ajanlarını, yaşlanma ile artan glial fibriler asidik protein düzeyini ve DNA'da oluşan oksidatif hasarı azalttığı tespit edilmiştir.²¹ Kalori kısıtlaması ile Sir2-ailesi proteinlerinin aktivasyonu, gıda sinyal yollarının modülasyonu, reaktif oksijen türlerinin ve dolayısıyla oksidatif hasarın azaltılması ve reaktif oksijen türlerine karşı direncin arttırılması yoluyla yaşlanmanın geciktiği ileri sürülmüştür.^{6,22,23,24} Kalori kısıtlamasının hücresele düzeyde antioksidan defans sistemine olumlu etkisi hala çelişkilidir. Bazı çalışmalar bu hipotezi desteklerken^{25,26,27} bir kısım çalışmada bu etki saptanamamıştır.^{28,29,30,31,32} Yapılan çalışmalar kalori kısıtlamasının farklı dokulara etkisini örneğin karaciğer, böbrek, lens üzerine

etkisini farklı yaş gruplarında özellikle de orta yaşlı ve yaşlı sığınarlarda incelemiştirlerdir. Uygulanan kalori kısıtlaması %30-60 arasında değişmektedir. Bizim çalışmamız bu hipotezi büyük oranda desteklemektedir. Literatürde rastlanan çelişkili veriler metodolojik farklar ve çalışılan dokuların farklı oluşu ve son olarak kullanılan deney grubunun yaşı ile ilişkili olabilir.

Sonuçta bu çalışma ile esansiyel vitamin ve mineral ihtiya-

yacı karşılanırken uygulanacak kalori kısıtlamasının eritrosit düzeyinde oksidan stresi azaltırken, antioksidan defans sistemini desteklediği saptanmıştır. Bu veriler yetişkin dönemde diet kısıtlamasının oksidan-antioksidan dengeyi antioksidan yönde ivmelendirerek olumlu etki sağladığını düşündürmektedir ve dolayısıyla etyolojisinde serbest radikallerin rol oynadığı birçok hastalığa ve yaşlanma sürecindeki olumsuzluklara karşı kalori kısıtlaması koruyucu bir önlem olabilecektir.

Kaynaklar

- Gültekin H, Şahin S, Budak N. Beslenme Davranışı: Farmakolojik Hedef Moleküller. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (E.Ü.Journal of Health Sciences) 2004;13(1):77-87. Derleme.
- Pannacciulli N, Del Parigi A, Chen K, Le DS, Reiman EM, Tataranni PA. Brain abnormalities in human obesity: a voxel-based morphometric study. Neuroimage. 2006; 31(4):1419-25.
- Craft S. Insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease: age- and obesity-related effects on memory, amyloid, and inflammation. Neurobiol Aging. 2005; 26 Suppl 1:65-9.
- Sriram K, Benkovic SA, Miller DB, O'Callaghan JP. Obesity exacerbates chemically induced neurodegeneration. Neuroscience. 2002; 115(4):1335-46.
- Çağlayan F, Çağlayan O, Günel E, Çakmak M. The effect of fasting on the oxidant stres, J Med Sci 2001; 21:374-376.
- Mannarino SC, Amorim MA, Pereira MD, Moradas-Ferreira P, Panek AD, Costa V, Eleutherio EC. Glutathione is necessary to ensure benefits of calorie restriction during ageing in Saccharomyces cerevisiae. Mech Ageing Dev. 2008; 129(12):700-5.
- Gong X, Shang F, Obin M, Palmer H, Scrofano MM, Jahngen-Hodge J, Smith DE, Taylor A. Antioxidant enzyme activities in lens, liver and kidney of calorie restricted Emory mice. Mech Ageing Dev. 1997; 99(3):181-92.
- Masoro EJ, Iwaski K, Gleiser CA, McMahan CA, Seo E, Yu BP. Dietary modulation of the progression of nephropathy in aging rats: an evaluation of the importance of protein, Am. J. Clin. Nutr. 1989; 49:1217-1227 Scopus.
- Van Kampen EJ, Zijlstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. Adv Clin Chem. 1965; 8:141-87.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol 1990; 186:421-431
- Wooliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood various breed crosses of sheep. Res Vet Sci. 1983; 34:69-77.
- Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984; 105:121-26.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med 1963; 61:882-90.
- Das M, Gabriely I, Barzilai N. Caloric restriction, body fat and ageing in experimental models. Obes Rev. 2004; 5(1):13-9.
- Percy CJ, Brown L, Power DA, Johnson DW, Gobe GC. Obesity and hypertension have differing oxidant handling molecular pathways in age-related chronic kidney disease. Mech Ageing Dev. 2009; 130(3):129-38.
- Salbe AD, Weyer C, Lindsay RS, Ravussin E, tataranni PA. Assessing risk factors for obesity between childhood adiposity, parental obesity, insülin, Leptin. Pediatrics 2002; 110:299-306.
- Gülden Burçak, Gülnur Andican. Oksidatif DNA Hasarı ve yaşlanma. (Oxidative DNA damage and aging) Cerrahpaşa J Med 2004; 35:159-169.
- Silver AE, Bekse SD, Christou DD, Donato AJ, Moreau KL, Eskurza I, Gates PE and Seals DR. 2007. Overweight and Obese Humans Demonstrate Increased Vascular Endothelial NAD(P) H Oxidase-p47 phox Expression and Evidence of Endothelial Oxidative Stres. Circulation. 2007; 115:627-637.
- Masoro EJ. Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms. Biochim Biophys Acta. 2009; 1790(10):1040-8.
- Ugochukwu NH, Mukes JD, Figgers CL. Ameliorative effects of dietary caloric restriction on oxidative stress and inflammation in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. Clin Chim Acta. 2006; 370(1-2):165-73.
- Yang MH, Schaich KM. Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. Free Radic Biol Med. 1996; 20(2):225-36.

22. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996; 5;273(5271):59-63. Review.
23. Barja G. Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. *Ageing Res.* 2002; 1:397-411. Review.
24. Merry BJ. Oxidative stress and mitochondrial function with aging the effects of calorie restriction. *Aging Cell* 2004; 3:7-12.
25. Koizumi A, Weindruch R, Walford RL. Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. *J. Nutr.* 1987; 117 (2):361-367.
26. Rao G, Xia E, Nadakavukaren MJ, Richardson A. Effect of dietary on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. *J. Nutr.* 1990;120 (6): 602-609.
27. Mote PL, Grizzle JM, Walford RL, Spindler SR. Influence of age and caloric restriction on expression of hepatic genes for xenobiotic and oxygen metabolizing enzymes in the mouse. *J. Gerontol.* 1991; 46 (3):95-100.
28. Rojas C, Cadenas S, Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Pamplona R, Prat J, Barja G, Relationship between lipid peroxidation, fatty acid composition, and ascorbic acid in the liver during carbohydrate and caloric restriction in mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 306 (1):59-64.
29. Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* 1994; 74:121-133.
30. Taylor A, Lipman RD, Jahngen-Hodge J, Palmer V, Smith D, Padhye N, Cyr GE, Laxman E, Shepard D, Morrow F, Salomon R, Perrone G, Asmundsson G, Meydani M, Blumberg J, Mune M, Harrison DE, Archer JR, Shigenaga M. Dietary calorie restriction in the Emory mouse: Effect on lifespan, eye lens cataract prevalence and progression, levels of ascorbate, glutathione, glucose, and glycohemoglobina, tail collagen breaktime, DNA and RNA oxidation, skin integrity, fecundity, and cancer. *Mech. Ageing Dev.* 1995a; 79:33-57.
31. Taylor A, Jahngen-Hodge J, Smith D, Palmer VJ, Dallal GE, Lipman RD, Padhye N, Frei B. Dietary restriction delays cataract and reduces ascorbate levels in Emory mice. *Exp. Eye Res.* 1995b; 61:55-62.
32. Gong X, Shang F, Obin M, Palmer H, Scrofano MM, Jahngen-Hodge J, Smith DE, Taylor A. Antioxidant enzyme activities in lens, liver and kidney of calorie restricted Emory mice. *Mech Ageing Dev.* 1997; 99(3):181-92.