

RADIKAL BEBAS, ANTIOKSIDAN DAN PENUAAN

*Dr. Fadil Oenzil, Ph.D**

Motto : *more life in our age and
more age in our life*

PENDAHULUAN

Oksigen secara mutlak dibutuhkan untuk kehidupan manusia. Proses produksi energi dalam tubuh melalui siklus Krebs terjadi dalam mitokondria sel dan membutuhkan oksigen (aerobik). Pada proses tersebut reduksi O_2 menjadi H_2O merupakan pengalihan 4 elektron. Bila pengalihan elektron berjalan kurang sempurna maka akan terbentuk senyawa-senyawa oksigen aktif yang berbahaya disebut radikal bebas.

Radikal bebas ini dapat merusak sel tubuh dan jaringan. Dalam tubuh setiap saat terjadi proses oksidasi tanpa kita lihat. Radikal bebas merusak seperti terjadinya karat pada logam atau perubahan warna coklat yang cepat pada potongan sebuah apel. Pengrusakan oleh radikal bebas melalui beberapa jalan seperti merusak membran lemak dari sel tubuh. Radikal bebas juga akan mengoksidasi LDL-kolesterol darah kemudian membentuk plak atau kerak-kerak yang akan menyumbat dinding bagian dalam pembuluh darah.

Radikal bebas akan mempercepat penumpukan "age pigment" atau pigmen lipofusin (pigmen penuaan) di dalam sitoplasma sel. Diketahui bahwa pigmen lipofusin ada hubungannya dengan penuaan pada tingkat sel saraf dan jantung. Penumpukan lipofusin ini akan menyebabkan terganggunya metabolisme sel-sel otak sehingga pada akhirnya akan merusak sel secara total. Penumpukan lipofusin berhubungan dengan menurunnya jumlah neuron. Sel otak dan jantung adalah "post mitotic cells" atau bersifat "unrenewable".

Lipofusin adalah granula yang bersifat autofluoresen terbentuk melalui polimerisasi oksidasi lipid dengan protein sel. Ada beberapa teori penuaan antara lain teori sel karena ketidakstabilan genetik sehingga terjadi kerusakan sel baik dari dalam maupun luar akibat peregangan dan relaksasi serat kolagen dan elastin terus menerus

* Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang

akan menyebabkan degenerasi. Teori autoimmun melalui media sistem imun sangat dipengaruhi genetik, endokrin dan lingkungan seperti diet. Sedangkan teori neuro endokrin mengatakan bahwa neural dan endokrin sebagai "pace maker" penuaan beberapa organ.

Antioksidan adalah bahan-bahan yang dapat membantu mencegah atau memperlambat pengrusakan oleh reaksi radikal bebas. Dalam tubuh terdapat mekanisme menangkal radikal bebas yang terdiri dari antioksidan enzimatis dan non-enzimatis. Antioksidan non-enzimatis di dalam makanan terdiri dari vitamin C, E dan betakaroten disamping flavonoid. Beberapa mineral yang berfungsi sebagai ko-faktor enzim antioksidan adalah : selenium (Se), seng (Zn), tembaga (Cu), besi (Fe) dan mangan (Mn). Bila keseimbangan antara oksidan dan antioksidan terganggu dalam klinik disebut "oxidative stress" dimana oksidan berlebihan dibandingkan dengan antioksidan dan meredamnya (Tjokroprawiro A 1993). Sedangkan Harman (1987) mengajukan teori bahwa reaksi radikal bebas bertanggung jawab akan meningkatnya kemungkinan penyakit dan kematian seiring dengan bertambahnya usia. Lipofusin menumpuk pada beberapa daerah sistem saraf pusat sejajar dengan aktivitas enzim. Peneliti lain (Sohal 1987) meneliti bahwa oxidative stress mempunyai peranan penting dalam proses penuaan, dimana oxidative stress ini juga meningkat dengan bertambahnya umur.

Tujuan makalah ini adalah menjelaskan peranan radikal bebas sebagai penyebab penuaan pada tingkat sel, proses pembentukan pigmen penuaan lipofusin dan pencegahan dengan antioksidan potensial yang terdapat dalam makanan.

RADIKAL BEBAS DAN ANTIOKSIDAN

Radikal bebas adalah oksidan yang dapat menerima elektron tapi radikal bebas memiliki elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas berbahaya karena reaktivitasnya tinggi dan cenderung membentuk radikal baru dan selanjutnya bila menemukan molekul lain akan membentuk radikal bebas baru lagi sehingga terjadi reaksi rantai (chain reaction). Reaksi rantai akan berhenti bila radikal bebas tersebut dapat diredam (quenced). Karena reaktivitas radikal bebas yang tinggi maka umumnya tidak stabil dan umurnya sangat pendek sehingga sulit dideteksi.

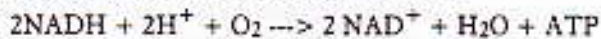
Jenis oksidan dan radikal bebas :

Oksidan dapat berasal dari eksogen dan endogen, sebagai oksidan eksogen adalah: asap rokok, polutan, nitrogen dioksida (NO₂) dan ozon (O₃). Sedangkan oksidan

endogen adalah : radikal anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal hidroksil ($\bullet OH$), radikal alkoksil ($RO\bullet$), radikal peroksil ($ROO\bullet$) dan singlet oksigen (1O_2).

Senyawa oksigen reaktif berasal dari oksigen (O_2) pada reaksi siklus Krebs. Siklus Krebs atau disebut juga siklus asam sitrat atau TCA (tricarboxylic acid cycle) terjadi di dalam mitokondria sel dimana asetil KoA (asetat aktif) dioksidasi menghasilkan CO_2 , membebaskan ekuivalen hidrogen yang akhirnya membentuk air dan menghasilkan ATP. ATP merupakan senyawa sumber energi bebas untuk jaringan bagi manusia yang dibentuk melalui proses fosforilasi oksidatif (Mayes 1988).

Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



Pada reaksi di atas terjadi reduksi O_2 menjadi H_2O sbb :



Pada proses tersebut reduksi O_2 menjadi H_2O merupakan pengalihan 4 elektron. Bila pengalihan elektron berjalan kurang sempurna maka akan terbentuk senyawa-senyawa oksigen berbahaya. Molekul oksigen sekarang dikatakan mempunyai di-radikal karena memiliki dua elektron yang tidak berpasangan tapi keduanya terletak pada orbital yang berbeda dan menunjukkan angka kuantum putaran yang sama dan memiliki putaran sejajar.

Akibatnya oksigen tidak sereaktif radikal hidroksil. Disamping itu akan terjadi senyawa-senyawa oksigen reaktif seperti O_2^- (ion superoksida), H_2O_2 (hidrogen peroksida), $ROO\bullet$ (radikal peroksil) dan $\bullet OH$ (radikal hidroksil). Ion superoksida, radikal peroksil, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil terjadi karena pengalihan elektron yang kurang sempurna pada saat terjadi reduksi oksigen. Molekul oksigen akan menjadi sangat reaktif bila kedua elektron tunggal disatukan dalam satu orbital dengan putaran yang berlawanan dengan perpindahan ini satu orbital menjadi kosong dan mudah diisi oleh sepasang elektron dengan putaran yang berlawanan disebut singlet oksigen.

Dampak negatif radikal bebas dapat mengenai membran sel, DNA maupun protein. Akibat akhir dari serangan radikal bebas terutama hidroksil pada membran sel adalah terbentuknya malonaldehida (MDA) dan gas melalui pernafasan yaitu etana dan pentana. Sedangkan perubahan pada DNA yang dapat terjadi adalah hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan inti purin dan pirimidin serta kemungkinan putusanya rantai fosfodiester DNA. Peneliti Sahu and Gray (1997) mene-

mukan bahwa radikal OH sebagai pencetus peroksidasi membran lipid inti sel yang akan menghasilkan radikal peroksil sehingga terjadi pecahnya rantai DNA. Kerusakan dapat diperbaiki melalui sistem perbaikan DNA (DNA repair system) sekiranya belum parah. Bila kerusakan sudah parah dimana rantai DNA terputus-putus kerusakan tidak dapat diperbaiki sehingga replikasi sel akan terganggu. Tapi perbaikan DNA ini sering menimbulkan mutasi karena terjadi kesalahan (error prone) dan bila mengenai gen tertentu yang disebut proto-onkogen maka mutasi dapat menjadi kanker. Oksidan dapat bereaksi dengan asam amino seperti sistein yang mengandung sulfhidril (SH) sehingga dapat terbentuk ikatan disulfida. Ikatan disulfida akan menimbulkan ikatan intra atau antara molekul protein akibatnya enzim kehilangan fungsinya.

Antioksidan

Dalam tubuh terdapat mekanisme menangkal radikal bebas yang terdiri dari antioksidan enzimatis dan non-enzimatis.

Antioksidan enzimatis terdiri dari : superoksida dismutase (SOD) yang berada dalam mitokondria (Mn SOD) dan berada dalam sitoplasma (Cu Zn SOD), katalase dalam sitoplasma, glutathion peroksidase. Antioksidan enzim mengandung mineral seperti enzim SOD (superoksida dismutase) mengandung mineral Mn (mangan), Cu (kuprum) dan Zn (seng). Seng merupakan komponen dari SOD yang sitosolik sedangkan Cu pada komponen SOD sitosolik dan seruloplasmin. Mangan merupakan komponen dari SOD di mitokondria. Enzim katalase mengandung besi sedangkan enzim glutathion peroksidase mengandung Se (selenium). Enzim-enzim antioksidan akan lemah bila mineral yang dikandungnya sebagai kofaktor tidak cukup. Sedangkan antioksidan non-enzimatis terdiri dari vitamin C, E dan betakaroten.

Antioksidan adalah bahan-bahan yang dapat membantu mencegah atau memperlambat pengrusakan oleh reaksi radikal bebas. Pada saat sekarang para ilmuwan menemukan kaitan antara reaksi oksidasi, kerusakan sel dan jaringan tubuh oleh radikal bebas dan perkembangan penyakit-penyakit kronis seperti : arthritis, atherosklerosis, kanker, katarak, penyakit jantung, gangguan paru-paru disamping proses penuaan.

Vitamin merupakan suatu molekul organik yang sangat diperlukan oleh tubuh untuk proses metabolisme dan pertumbuhan fisiologis. Vitamin dapat digolongkan pada kelompok vitamin larut dalam lemak (vitamin A, D, E dan K) dan kelompok larut dalam air (yang terdiri dari vitamin C dan vitamin B).

Vitamin yang larut dalam lemak banyak terdapat dalam ikan, minyak ikan, dan biji-bijian sumber minyak seperti kacang tanah, kacang kedelai dan sebagainya. Vitamin larut dalam lemak diserap dengan lemak makanan dan dapat disimpan dalam hati atau jaringan lemak lainnya. Defisiensi vitamin larut dalam lemak akan terjadi bila penyerapan lemak terganggu.

Vitamin larut dalam air bergerak bebas dalam darah, badan dan cairan limfa. Vitamin larut dalam air tersebut mudah rusak dalam pengolahan dan mudah hilang karena tercuci atau terlarut dalam air. Sedangkan vitamin antioksidan larut dalam lemak terdiri dari betakarotin dan E sedangkan larut dalam air adalah vitamin C.

Antioksidan lain dalam tubuh adalah asam urat dan ubiquinon. Flavanoid suatu antioksidan dulu disebut juga sebagai vitamin P merupakan suatu senyawa fenon.

Vitamin antioksidan

Pembentukan lipofusin dapat dikurangi dengan senyawa antioksidan. Syubei *et al.* (1991) menggunakan vitamin E untuk mencegah penumpukan pada kultur sel otak tikus.

Betakarotin

Betakarotin merupakan provitamin A. Betakarotin sebagai antioksidan dan pada tekanan parsial oksigen yang rendah. Berfungsi sebagai antioksidan yang dapat meredam reaktivitas radikal bebas pada jaringan tubuh, serta melindungi sel dari kerusakan oksidatif yang merupakan langkah awal karsinogenesis. Sehingga betakarotin dikatakan dapat menurunkan risiko kanker. Betakarotin bekerja pada tekanan oksigen yang rendah, dan dapat menggantikan fungsi vitamin E yang memerlukan tekanan oksigen tinggi.

Sumber vitamin betakarotin adalah sayuran berwarna hijau tua dan kuning jingga seperti: bayam, wortel, labu, ubi jalar. Sumbernya juga berasal dari buah-buahan warna kuning sampai jingga seperti: mangga, pepaya, dll. Terdapat hubungan langsung antara derajat kehijauan sayuran dengan betakarotin. Semakin hijau warna daun tersebut maka semakin tinggi kadar karotinya, sedangkan daun-daunan berwarna pucat seperti kol dan selada mengandung miskin karotin. Wortel, ubi jalar dan bayam mengandung betakarotin berturut-turut 6,6 mg, 5,9 mg dan 4,9 mg per 100 gram bagian dapat dimakan (bdd). Sedangkan mangga, semangka berturut-turut 2,9 dan 2,0 mg betakarotin per 100 gram bdd.

Betakarotin dianjurkan dikonsumsi 5-6 mg perhari oleh U.S Department of Agriculture and the National Cancer Institute. Makan betakarotin yang berlebihan akan mengakibatkan warna kulit menjadi kekuningan.

Vitamin C

Vitamin C termasuk kelompok vitamin larut dalam air sehingga akan dibuang melalui urin bila dimakan berlebihan. Vitamin C tidak dapat dibuat oleh tubuh sendiri, dengan demikian vitamin C ini harus tersedia secara terus menerus agar tidak timbul gejala defisiensi. Fungsi vitamin C adalah berperan dalam pembentukan kolagen. Kolagen merupakan protein komponen utama jaringan ikat, tulang rawan, matriks tulang, dentin dan lapisan endotel pembuluh darah. Vitamin C juga berperan sebagai ko-enzim, sintesis karnitin dan membantu penyerapan zat besi. Sebagai vitamin antioksidan vitamin C bekerja dengan menetralkan radikal bebas. Sumber vitamin C terutama sayuran dan buah-buahan segar. Buah yang makin muda makin tinggi kandungan vitamin C dan sebaliknya semakin tua buah tersebut maka semakin sedikit kandungan vitamin C nya. Buah jeruk merupakan sumber vitamin C yang tinggi. Vitamin C larut dalam air, mudah rusak oleh oksidasi, panas dan suasana alkali. Kebutuhan vitamin C perhari untuk orang dewasa dianjurkan 30 mg baik untuk laki-laki maupun wanita. Dalam 100 gram jeruk manis mengandung 50 mg vitamin C.

Vitamin E

Vitamin E disebut juga tokoferol. Secara kimia ada kemiripan antara vitamin E dengan hormon-hormon seks. Berbagai biji-bijian dan kacang-kacangan merupakan sumber kaya akan vitamin E khusus biji yang sudah berkecambah.

Peranan vitamin E terutama sebagai antioksidan yang larut dalam lemak. Vitamin E dapat memusnahkan aktivitas radikal bebas pada asam lemak tidak jenuh, memadamkan reaktivitas singlet oksigen. Kebutuhan yang dianjurkan adalah 10 mg untuk laki-laki dan 8 mg untuk wanita dewasa dan manula.

Flavanoid

Flavanoid pertama dijumpai di dalam lemon dan citrus yang disebut flavanon yang mempunyai warna kuning pucat sampai tidak berwarna. Beberapa jenis sayuran diduga mengandung flavanoid sedangkan teh dan anggur merah juga mengandung tinggi flavanoid. Pada buah anggur dan sayuran terdapat flavanoid dalam bentuk

kompleks dengan glikosida sehingga sangat sulit dicerna dan diserap. Pada saat fermentasi anggur merah maka senyawa kompleks ini akan terurai menjadi bentuk monomer dan adanya alkohol (10%) dalam anggur akan membuat kandungan flavonoid menjadi stabil dan mudah diserap. Peneliti Lugasi *et al.* (1997) menyimpulkan bahwa senyawa fenol baik flavonoid maupun tidak di dalam minuman anggur merah mempunyai kesanggupan menghambat oksidasi LDL-kolesterol, sintesis eicosanoid dan menghambat agregasi platelet serta merangsang faktor relaksasi endotel sehingga disimpulkan mempunyai efek yang baik untuk menurunkan penyakit jantung koroner.

Tempe suatu makanan tradisional juga diduga mengandung antioksidan.

Flavonoid dapat mencegah kerusakan vitamin C, peranan lain flavonoid ini masih banyak seperti menghambat agregasi platelet, menghambat pertumbuhan sel kanker dan relaksasi vaskular. Flavonoid dapat mempengaruhi metabolisme dopamin dan derivatnya yang disebut sebagai sumber tenaga dalam fungsi otak yang dikenal juga untuk neurotransmitter. Ekstrak daun teh hijau (*Camelia sinensis*) mengandung garam-garam catechin yang dapat juga merangsang metabolisme neurotransmitter (Oenzil *et al.* 1992). Flavonoid dapat meredam peroksinitrit sehingga diduga mempunyai manfaat untuk serangan penyakit jantung koroner (Haenen *et al.* 1997). Suatu penelitian membandingkan kekuatan meredam radikal bebas hidroksil dan anion superoksida oleh Noda *et al.* (1997) berturut-turut ditemukan mulai dari yang kuat adalah: *Ginkgo biloba extract*, *pygnogenol* (pine bark extract), beta catechin dan teh. Sedangkan Smith *et al.* (1996) meneliti bahwa daun *Ginkgo biloba* suatu obat tradisional China bersifat neuroprotektif karena dapat meredam radikal bebas dan salah satu komponen yang dikandungnya adalah ginkgolide B mempunyai kesanggupan sebagai antagonis platelet activating factor (PAF). Peneliti lain Dehmlow *et al.* (1996) menemukan suatu flavonoid silibinin untuk pengobatan penyakit hati sebagai peredam kuat radikal bebas dengan menghambat leukotrien sehingga dapat dipakai tidak hanya untuk hepatoprotektif tapi juga sitoprotektif organ lain. Sedangkan Wu *et al.* (1996) menemukan bahwa flavonoid morin jauh lebih kuat dari vitamin E dalam mencegah oksidasi LDL-kolesterol oleh radikal bebas. Saija *et al.* (1995) juga meneliti empat flavonoid yang berasal dari tanaman yaitu quercetin, hesperetin, naringenin dan rutin menemukan bahwa flavonoid tersebut dapat mengurangi reaksi peroksidasi lipid membran oleh radikal bebas. Sedangkan Terao *et al.* (1994) meneliti efek antioksidan dari epikatekin, epikatekingalat dan quercetin melawan peroksida lemak bila membran sel dikenai radikal bebas dalam cairan.

Suatu sintetik flavon dapat mempunyai efek pengobatan sebagai vasodilatasi ditemukan oleh Girard *et al.* (1995)

PROSES PENUAAN

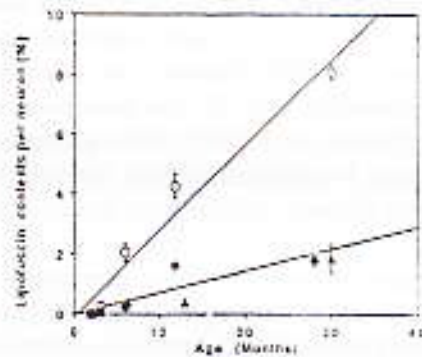
Ada beberapa teori penuaan antara lain teori sel karena ketidak stabilan genetik sehingga terjadi kerusakan sel baik dari dalam maupun luar akibat peregangan dan relaksasi serat kolagen dan elastin terus menerus akan menyebabkan degenerasi. Teori autoimun melalui media sistem imun sangat dipengaruhi genetik, endokrin dan lingkungan seperti diet. Sedangkan teori neuro endokrin mengatakan bahwa neural dan endokrin sebagai 'pace maker' penuaan beberapa organ.

Teori penumpukan pigmen lipofusin sebagai pertanda penuaan sel. Lipofusin ini akan menumpuk di dalam sel otak terutama inti hippocampus sesuai dengan pertambahan umur, lihat Gambar 1 dan 2 (Oenzil *et al.* 1994). Sedangkan Nakano *et al.* (1995) membandingkan bahwa lipofusin lebih cepat menumpuk dalam sel otot jantung dari sel neuron otak. Seperti diketahui bahwa sel otot jantung dan sel neuron otak adalah sel post mitotik yang akan bertumbuh sekiranya terjadi kerusakan sel total (unrenewable).

Penumpukan granula autofloresen lipofusin merupakan fenomena penting dalam proses penuaan dimana pigmen ini menumpuk dalam sel otot jantung dengan bertambahnya umur (Nakano *et al.* 1989). Nakano *et al.* menyatakan bahwa kecepatan penumpukan lipofusin tergantung dari life span pemakaian energi dalam jaringan. Pada penelitian lanjutan (Nakano *et al.* 1990) bahwa pemunculan pertama lipofusin mempunyai korelasi dengan kematangan seksual. Selanjutnya Nakano dan Gotoh (1992) menemukan bahwa pigmen lipofusin ini menumpuk tergantung dari kecepatan metabolisme dari mammalia dan menyatakan bahwa fenomena penting penuaan adalah kematangan seksual (pubertas) merupakan titik permulaan dari proses penuaan. Hubungan antara penumpukan pigmen lipofusin dengan bertambahnya umur sudah diteliti pada sistem saraf manusia (Mann *et al.* 1978) serta korteks otak manusia sejak baru lahir sampai umur 95 tahun (Brody 1960), pada otak anjing dan porcine (Whiteford and Getty 1966), pada sistem saraf babi lanjut umur (Nanda and Getty 1973) dan di dalam otak primata (Brizzee *et al.* 1974). Peneliti lain Bancher *et al.* (1989) melaporkan bahwa reaksi imun lipofusin identik pada pasien Alzheimer dengan kelompok kontrol pada umur yang sama. Penyakit Alzheimer adalah penyakit penuaan dengan dementia senilis.

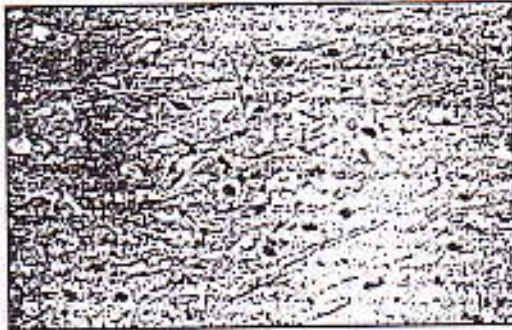
Pembentukan lipofusin berasal dari interaksi antara oksida lipid dengan protein sel yang menghasilkan polimer berbentuk lipofusin (Gutteridge 1987). Pigmen ini mempunyai bermacam-macam nama seperti: chromolipid, hemofuscin, ceroid, lipochrome, cytolipofuscin, atau wear and tear pigment. Lisozom diduga sebagai sumber utama lipofusin di dalam sel (Zs-Nagy 1987). Disamping itu organel sel yang lain seperti mitokondria berperan dalam pembentukan lipofusin. Lipofusin merupakan suatu penumpukan bahan sampah di dalam sel. Pigmen lipofusin disebut juga pigmen penuaan karena penumpukannya dapat mengganggu proses metabolisme sehingga akhirnya sel tersebut dapat rusak. Penumpukan lipofusin tentu akan mempercepat penuaan sel sampai mematikan sel itu sendiri (degenerasi). Bila mengenai sel otak atau saraf rusak maupun sel jantung maka jaringan ini tidak dapat tumbuh kembali sehingga fungsi sel otak, saraf dan sel jantung tersebut juga terganggu. Proses penuaan pada sel otak dan saraf akan membuat kita pelupa maupun lemah tidak bersemangat.

Otak berfungsi untuk mengatur metabolisme. Penuaan pada otak akan menimbulkan berkurangnya neuron, dendrit dan dendritik spinalis pada berbagai area otak (Duckett 1991).

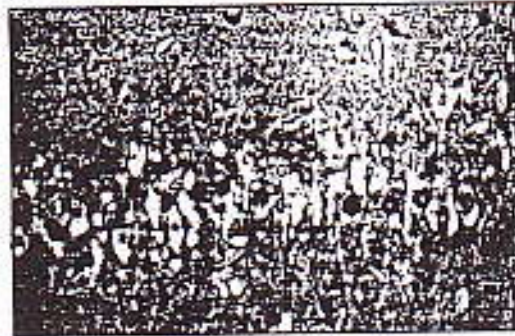


Gambar 1 : Persentase area lipofusin per area otak (○ hippocampus • = cortex cerebri dan ▲ = thalamus sebagai garis fungsi terhadap umur (Oenzil *et al.* 1994)

A



B



C



Gambar 2 : Gambar mikrofotograf fluoresen lipofusin pada A=lamina III cortex cerebri, B=hippocampus dan C=thalamus (Oenzil *et al.* 1994)

PENUTUP

Proses penuaan dapat diperlambat dengan zat gizi antioksidan seperti vitamin C, E, betakarotin, seng, selenium, kuprum, besi dan mangan. Flavonoid sebagai zat antioksidan yang dulu disebut sebagai vitamin P. Vitamin C, E dan betakarotin mempunyai kesanggupan untuk menetralkan radikal bebas dan reaksi kimia lain. Secara essential vitamin antioksidan mengakhiri reaksi kimia yang berbahaya sehingga dapat melindungi sel tubuh. Banyak penelitian diadakan berkaitan dengan pemakaian vitamin antioksidan tambahan dalam mengurangi risiko penyakit-penyakit seperti: jantung, kanker, katarak dll. yang berhubungan dengan pengrusakan akibat radikal seperti proses penuaan. Flavonoid merupakan kelompok antioksidan untuk memperlambat proses penuaan dan meningkatkan energi otak melalui neurotransmitter. Pada hasil penelitian didapatkan hubungan yang kuat antara menurunnya risiko berbagai penyakit kronis dan diet tinggi antioksidan. Disamping itu antioksidan sudah terbukti memperlambat proses penuaan.

KEPUSTAKAAN

Tjokroprawiro A. Radikal bebas: Aspek klinik dan kemungkinan aplikasi terapi. Kumpulan naskah simposium oksidan dan antioksidan: peranannya dalam mencegah progresivitas kelainan pembuluh darah. Surabaya, 1993.

Harman D. Free radical theory of aging: current status. In: Lipofuscin-1987: state of the art. (Ed. Imre ZS - Nagy). Proceedings of an International Symposium held in Debrecen, Hungary 1987: pp3-21.

Sohal RS. Oxidative stress and cellular aging. In: Lipofuscin- 1987: state of the art. (Ed. Imre ZS.- Nagy). Proceedings of an International Symposium held in Debrecen, Hungary 1987: pp 135- 144.

Mayes PA. The citric acid cycle: the catabolism of acetyl-CoA. In: Harper's Biochemistry' 21st Edn. (Eds.R.K.Murray, D.K. Grannes, P.A Mayes and V.W.Rodwell). (Appleton and Lange: California). 1988:pp 149-157.

Sahu SC and Gray GC. Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. food Chem Toxicol 1997;35:443-447.

Lugasi A, Blazovics A, Dworschk E and Feher I. Cardio-protective effect of red wine as reflected in the literature. Orv Hetil 1997; 138:673-678.

Oenzil F, Nakano M and T Mizuno T. Effect of green tea leaf on neurotransmitter rat brain metabolism, Institute for Medical Science of Aging, Aichi Medical University, Japan, 1992

Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE and bast A. Peorxynitrite scavenging by flavonoids. Biochem Biophys Res Commun 1997; 236: 591 - 193.

- Noda Y, Anzai K, Mori A, Kohno M, Shinmei M and Packer L. Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. *Biochem Mol Biol Int* 1997;42:35-44.
- Smith PF, MacLennan K and Darlington CL. The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *J Ethnopharmacol* 1996;50:131-139.
- Dehmlow C, Murawski N and de Groot H. Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells. *Life Sci* 1996;58: 1591- 1600.
- Wu TW, Fung KP, Wu I, Yang CC, Lo J and Weisel RD. Morin hydrate inhibits azobutylator induced oxidation of human low density lipoprotein. *Life Sci* 1996;58:pl
- Sajja A, Scialese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F and Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med* 1995;19:481-486
- Girard P, Sercombe R, Sercombe C, Le Lem G, Seylaz J and Potier P. A new synthetic flavonoid protects endothelium-derived relaxing factor-induced relaxation in rabbit arteries in vitro: evidence for superoxide scavenging. *Biochem Pharmacol* 1995;49:1533- 1539.
- Terao J, Piskula M and Yao Q. Protective effect of epicatechin, catechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch Biochem Biophys* 1994;308:278-284.
- Oenzil F, Kishikawa M, Mizuno T and Nakano M. Age-related accumulation of lipofuscin in three different regions of rat brain. *Mech. Ageing Dev.* 1994;76: 157-163.
- Nanako M, Oenzil F, Mizuno T and Kishikawa M. Age-related changes in the lipofuscin accumulation of brain and heart. *Gerontology.* 1995; Suppl 2, 41: 69-79.
- Nakano M, Mizuno T, Katoh H and Gotoh S. Age-related accumulation of lipofuscin in myocardium of Japanese monkey (*Macaca Fuscata*). *Mech. Ageing Dev.* 1989;49: 41-48.
- Nakano M, Mizuno T and Gotoh S. Accumulation of cardiac lipofuscin in mammals correlation between sexual maturation and the first appearance of lipofuscin. *Mech. Ageing Dev.* 1990; 52: 93-106.
- Nakano M and Gotoh S. Accumulation of cardiac lipofuscin depends on metabolic rate of mammals. I. *Gerontol* 1992; 47: B 126-129.
- Mann DMA, Yates PO and Stamp IE. The relationship between lipofuscin pigment and ageing in the human nervous system. *J Neurol Sci* 1978;37 83-93.
- Brody H. The deposition of aging pigment in the human cerebral cortex. *J Gerontol* 1960;15:258-261.
- Whiteford r and Getty R. Distribution of lipofuscin in the canine and porcine brain as related to aging. *J Gerontol* 1966;21:31-44.
- Nanda BS and Getty R. Occurrence of aging pigment (lipofuscin) in the nuclei and cortices of the canine brain. *Exp Geront* 1973;8: 1-7.

Brizzeo KR, Ordy JM and Kaack B. early appearance and regional differences intraneuronal and extraneuronal lipofuscin accumulation with age in the brain of a nonhuman primate (*Macaca mulatta*). *J. Gerontol* 1974;29:366-381.

Bancher C, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Kim KS and Wisniewski HM. Immunoreactivity of neuronal lipofuscin with monoclonal antibodies to the amyloid beta-protein. *Neurobiol Aging* 1989;10:125-132.

Gutteridge JMC. Oxygen radicals, transition metals and ageing. In E. Aloj Totaro, P Glees and PA Pisanti (eds.) *Advances in age pigment research*, Pergamon Press, 1987;pp 1-22.

Zs-Nagy I. Theoretical background and cellular autoregulation of biological waste product formation. In: *LipoEscin-1987: state of the art* (Ed. hore ZS.- Nagy). Proceedings of an International Symposium held in Debrecen, Hungary 1987: pp 23-50.

Duckert S. The normal aging human brain. In: *The pathology of the aging human nervous system*. (Ed. S Duckert). Lea and Febiger, Philadelphia, 1987;pp 1-19