

Biochemical assessment of the anti-aging effects of cosmetic products

PETER T. PUGLIESE, M.D., CHERYL B. LAMPLEY, B.A. - Xienta Institute for Skin Research P.O. Box 98 - Bernville, Pa. U.S.A. 19506

Received: March 8, 1985. Presented at the International Meeting a New Look at Old Skin: A Challenge to Cosmetology, March 7-9, 1985 Rome - Italy

Key words: Malonyldialdehyde, Free Radicals, Epidermis and Cosmetics

Summary

The purpose of this study was to develop an *in vivo* biochemical system that would be capable of assessing the ability of cosmetic products to attenuate the aging process due to free radical induced lipid peroxidation. — A large literature back-up supports the free radical concept as an etiologic factor in the aging process. The measurement of malonyl dialdehyde (MDA) an active end product of lipid peroxidation involved in the aging process is also well documented. The system to be reported uses the thiobarbituric acid method to measure MDA in the hairless mouse model. Free radical formation is induced by ultraviolet light irradiation in the UVB region (290-320 nm). Reduction of, or inhibition of MDA in the treated animals is an indication of the possible effectiveness of an anti-aging product. — The use of a number of cosmetic ingredients including alpha tocopheryl acetate and beta carotene were effective in reducing the MDA value by 40 to 80% of the control value. — The method of UVB induced free radical formation and resulting lipid peroxidation can be used to determine the efficacy of anti-aging products by measuring the level of MDA. The system has proven useful in designing formulations that provide objective evidence of topical efficacy in reducing lipid peroxidation.

Introduction

The etiologic factors involved in the aging process may be classified into two general mechanisms: (1) genetic factors, and (2) environmental factors. The present state of our knowledge suggests that aging is a process which is influenced by

Riassunto

Lo scopo di questo studio era quello di sviluppare un sistema biochimico *in vivo* per valutare la capacità dei prodotti cosmetici di attenuare il processo di invecchiamento dovuto ai radicali liberi indotti dalla perossidazione lipidica. Il concetto di radicale libero quale fattore eziologico del processo di invecchiamento è comprovato da molti dati della letteratura. È anche ben documentata la misurazione della malonildialdeide (MDA) come prodotto finale attivo della perossidazione lipidica coinvolta nel processo di invecchiamento. Il sistema di cui riferiamo utilizza il metodo dell'acido tiobarbiturico per misurare l'MDA nella prova sul topo privo di peli. La formazione di radicali liberi è indotta da irradiazione con luce ultravioletta nella regione dell'UVB (290-320 nm). La riduzione o l'inibizione dell'MDA negli animali trattati è una indicazione della possibile efficacia di un prodotto anti-invecchiamento. L'uso di numerosi ingredienti cosmetici, compresi l'alfa tocoferil acetato e il beta carotene, è stato efficace nella riduzione del valore dell'MDA dal 40 all'80% del valore di controllo. Il metodo della formazione di radicali liberi indotti da UVB e la conseguente perossidazione lipidica può essere utilizzato per determinare l'efficacia dei prodotti anti-invecchiamento attraverso la misurazione del livello dell'MDA. Il sistema si è dimostrato utile per formulare composti in grado di fornire una prova obiettiva di efficacia topica nella riduzione della perossidazione lipidica.

Introduzione

I fattori eziologici coinvolti nel processo di invecchiamento possono essere classificati in due meccanismi generali: (1) fattori genetici e (2) fattori ambientali. Secondo lo stato attuale delle nostre conoscenze l'invecchiamento è un processo in-

Table I
Nanomoles MDA/Milligrams Protein

Mouse #	Control Site	UV Treated Site	% Increase MDA
1	1.80	2.95	63.89
2	2.01	6.02	199.50
3	3.00	6.57	119.00
4	2.09	5.45	160.77
5	2.70	8.07	198.89
6	3.13	8.54	172.84
7	0.54	7.36	1262.96
8	1.40	7.50	435.71
9	1.79	5.40	201.68
10	1.99	7.00	251.76
Mean	2.045	6.486	306.70
S.E.	0.243	0.514	110.64

a relatively small group of harmful changes that occur in the non-replenishing components of the living system. That is to say, some irreversible event has taken place that has an adverse effect on cell stability, or homeostasis.

At the cellular level these events may take the form of a change in membrane properties; an accumulation of age pigment; a dysfunction of the translation machinery; or some damage to the basic replication mechanism — deoxyribonucleic acid (DNA). At the molecular level therefore the biochemical events leading to mitotic arrest in certain body cells is probably the basic origin of the process that leads to eventual aging of humans and other higher forms of life (1-3). The control of cellular proliferation is by selective stimulation and inhibition of the proliferative process which is believed to relate to the transcription of RNA and the synthesis of certain proteins (4,5). It has been shown that enzymes isolated from aged, or old tissue exhibit a decrease in the rate of catalysis of specific reaction (6,7,8). There may be slower turnover rate of enzymes in aging tissues or there may be an inactivation of enzymes due to subtle molecular rearrangement (9,10).

fluenzato da un gruppo relativamente piccolo di cambiamenti anomali che si verificano nei distretti privi di turnover. Vale a dire, si verifica un evento irreversibile che ha un effetto negativo sulla stabilità cellulare, ovvero sull'omeostasi.

A livello cellulare questi eventi possono assumere la forma di una modificazione delle proprietà della membrana; un accumulo del «pigmento dell'età»; una disfunzione dell'apparato di traslazione; o un qualche danno al fondamentale meccanismo di duplicazione — acido desossiribonucleico (DNA). Al livello molecolare, perciò, i fenomeni biochimici che portano all'arresto mitotico in certe cellule del corpo sono probabilmente la causa prima del processo d'invecchiamento degli esseri umani e delle altre forme superiori di vita (1, 2, 3). Il controllo della proliferazione cellulare avviene per stimolazione selettiva e inibizione del processo proliferativo che si ritiene sia collegato alla trascrizione dell'RNA ed alla sintesi di certe proteine (4, 5). Si è dimostrato che gli enzimi isolati dal tessuto in fase di invecchiamento o vecchio mostrano una diminuzione della velocità di catalisi di reazioni specifiche (6, 7, 8). Si può verificare una più ridotta velocità di ricambio de-

Table II
5% Vitamin E
Nanomoles MDA/Milligram of Tissue Protein

Mouse #	Untreated	Irradiated	Treated	Irradiated	% Reduction
1		3.75	2.65		29.33
2		4.73	3.02		36.15
3		7.08	4.10		42.09
4		8.48	3.50		58.73
5		7.28	3.80		47.80
6		8.05	4.60		42.86
7		6.31	1.50		76.23
8		6.44	2.20		65.84
9		5.56	1.98		73.38
10		5.98	2.04		65.89
Mean		6.366	2.889		53.83
S.E.		0.459	0.346		5.17

The presence of «age pigment», or lipofuscin, is a consistent phenomenon in aged tissue. The formation of this material may be related to the same process as enzyme inactivation since both processes could involve reactions with lipid peroxidation end products (10,11). In addition to enzyme inactivation the loss of ribosomal deoxyribonucleic acid in aging cells is also a very significant finding (12,13). This process may be related to a central concept of aging linked to lipid peroxidation of cell membranes and subsequent production of reactive by-products. This concept prompted the experimental design of a mammalian model to assess the effects of topical products on lipid peroxidation.

Methods and materials

The use of the hairless mouse (SKH/Hr) in epidermal research is well documented. Ultraviolet light in the UVB range 290-320 nanometers is known to induce the enzyme ornithine decarboxylase in the epidermis. Ultraviolet light is also known to induce free radical formation.

gli enzimi nei tessuti in fase di invecchiamento o una inattivazione di enzimi dovuta ad una diversa sistemazione molecolare (9, 10).

La presenza del «pigmento dell'età», ovvero la lipofuscina, è un fenomeno rilevante del tessuto invecchiato. La formazione di questo materiale può essere collegata allo stesso processo dell'inattivazione enzimatica giacché ambedue i processi possono coinvolgere reazioni con i prodotti finali della perossidazione lipidica (10, 11). Oltre all'inattivazione enzimatica, la perdita di acido desossiribonucleico ribosomiale nelle cellule in fase di invecchiamento rappresenta anch'essa un fenomeno molto significativo (12, 13). Questo processo può essere collegato ad un concetto centrale di invecchiamento legato alla perossidazione lipidica delle membrane cellulari e alla conseguente produzione di sotto-prodotti reattivi. Questo concetto ha ispirato il progetto sperimentale di una prova su mammiferi per valutare gli effetti di prodotti topici sulla perossidazione lipidica.

Table III
5% Beta-Carotene
Nanomoles MDA/Milligrams Protein

Mouse #	Untreated Irradiated	Treated Irradiated	% Reduction
1	5.84	1.98	66.10
2	7.58	3.54	53.30
3	8.61	3.02	64.92
4	6.35	2.54	60.00
5	8.71	4.07	53.27
6	5.08	3.04	40.16
7	4.36	2.01	53.90
8	6.79	3.61	46.83
9	3.16	1.90	39.86
10	5.44	4.00	26.47
Mean	6.192	2.971	50.48
S.E.	0.567	0.263	3.91

(16) We choose therefore to irradiate the hairless mouse with UVB to induce lipid peroxidation by initiation of free radical formation. Animals were housed under standard laboratory conditions, maintained on autoclavable Laboratory Rodent Chow 50-10, and conditioned for two weeks after purchase. Mice were 6-8 weeks of age at time of shipment to the laboratory.

Two squares (4 cm² each) were outline on the dorsal side of the mouse, using a black felt tip pen. The squares were separated by a margin of 1 cm. The squares were designated as Site 1 (anterior dorsal square) and Site 2 (posterior dorsal square). An aliquot of 50 microliters of the product was applied to Site 1 or Site 2 as determined by the randomization code. The untreated site served as the irradiated control. The mice were irradiated 15 minutes after product application. The mice were anesthetized with sodium pentobarbital intraperitoneally (50 mg/ml) at a dosage of .5 mg/10 g of body weight. The ultraviolet light sources were two Westinghouse FS-40 lamps with a peak output of 313 nanometers. No effort was made to shield against UVA (370-400

Materiali e metodi

L'uso del topo privo di peli (SKH/Hr) nella ricerca dermatologica è ben documentato. È noto che la luce ultravioletta nell'intervallo UVB da 290 a 320 nanometri stimola nell'epidermide l'enzima ornitina decarbossilasi. È anche noto che la luce ultravioletta induce la formazione di radicali liberi (16). Si è scelto, perciò, di irradiare con UVB il topo privo di peli per indurre la perossidazione lipidica attraverso la formazione di radicali liberi. Gli animali sono stati tenuti in condizioni standard di laboratorio, alimentati con Laboratory Rodent Chow 50-10 autoclavabile, e condizionati per due settimane dopo l'acquisto. Al momento della consegna al laboratorio i topo avevano da 6 a 8 settimane.

Sulla zona dorsale del topo sono stati disegnati due quadrati (di 4 cm² ciascuno), usando un pennarello nero. I quadrati erano separati da un margine di 1 cm. I quadrati sono stati designati come Zona 1 (quadrato dorsale anteriore) e Zona 2 (quadrato dorsale posteriore). Seguendo uno schema randomizzato, è stata applicata una quantità del prodotto pari a 50

Table IV
Product with Vitamin E and Beta Carotene
Nanomoles MDA/Milligram Protein

Mouse #	Control Irradiated	Treated Irradiated	% Reduction
1	7.20	4.12	42.78
2	9.50	5.70	40.00
3	4.50	2.01	55.33
4	8.87	3.94	55.58
5	6.70	5.01	25.22
6	12.40	4.47	63.95
7	8.61	2.94	65.85
8	4.55	2.38	47.69
9	5.33	2.49	53.28
10	6.69	4.56	31.84
Mean	7.435	3.762	48.15
S.E.	0.781	0.393	4.19

nm) or UVC (below 290 nm). The irradiance was measured with a Model 61 Optometer (United Detector Technology) employing a sharp band filter at 313 nanometers (± 5 nm). The total dosage given was 200 millijoules/cm² over 6 minutes and 40 seconds.

Preparation of the Homogenate:

The animals were sacrificed 9 hours later by cervical dislocation. The skin was removed and stretched over a styrofoam block, care being taken not to apply above normal tension. The epidermis was separated from the dermis by heating the skin in water for 60 seconds at 52°C, and then scraping the surface with a scapel blade. The tissue is then placed in a 50 ml beaker to which 3 volumes of normal saline are added. The beakers are maintained at 4°C with an ice bath. The tissue is homogenized with a Heat Systems Sonicator (Model W-10) with two 30 second bursts at a 10 second interval. The homogenate is then centrifuged at 4°C for 15 minutes at 30,000xg. The resultant clear supernatant is used for analysis in malonyldialhyde (MDA).

microlitri sulla Zona 1 o 2. Un'area non trattata e irradiata è servita come controllo. I topi sono stati irradiati 15 minuti dopo l'applicazione del prodotto.

I topi sono stati anestetizzati con pentobarbital sodico per somministrazione intraperitoneale (50 mg/ml) con un dosaggio di 5 mg/10 g. di peso corporeo. Le fonti di luce ultravioletta erano due lampade Westinghouse FS-40 con una uscita massima di 313 nanometri. Non si è fatto alcun tentativo di schermatura contro gli UVA (370-400 nm) o gli UVC (al di sotto di 290 nm). L'irradiazione è stata misurata con un optometro Modello 61 (United Detector Technology) utilizzando un filtro a banda stretta a 313 nanometri (± 5 nm). Il dosaggio totale dato era di 200 millijoules/cm² in 6 minuti e 40 secondi.

Preparazione dell'omogenato

Gli animali sono stati sacrificati 9 ore più tardi. La pelle è stata rimossa e distesa su un blocco «styrofoam», avendo cura di applicarla con una tensione non superiore alla norma. L'epidermide è stata sepa-

Assay for MDA:

All assays are done in duplicate. Seven hundred microliters of supernatant is added to 1 ml of glacial acetic acid and 2 ml of 0.5% of 2-thiobarbituric acid, and the mixture is then vortexed. The mixture is boiled for 10 minutes with the top of the test tube being covered with a marble, which acts as a condensor. The tubes are cooled with running tap water and the color development is determined with a spectrophotometer at 531 nm. The nanomoles of MDA produced is determined by the following formula:

$$\text{nanomoles MDA} = \frac{\text{OD} \times V_f}{0.15}$$

Where OD is the optical density at 531 nanometers. V_f is the final volume of the mixture, and 0.15 is the extinction coefficient of MDA $\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Blanks were also carried through the procedure; 700 microliters of water are substituted for the homogenate. Protein determinations of each sample were performed using two hundred microliters of supernatant from each sample. The method employed is the Sigma Micro Protein Determination (Sigma Technical Bulletin # 690).

Result

Figure 1 shows that relationship between the dosage of ultraviolet radiation and amount of MDA produced. There is a maximum response at a single dose of 200 millijoules/cm² with a rapid fall off above this dosage. Figure 2 shows the relationship between the amount of MDA produced by 200 millijoules/cm² irradiation and the time of the assay. From this study it appears that 9 hours post-irradiation is the best time to sacrifice the animal for optimum MDA production.

rata dal derma riscaldando la pelle in acqua a 52°C per 60 secondi, pulendo la superficie con un bisturi. Il tessuto è stato poi collocato in un beaker di 50 ml a cui sono stati aggiunti tre parti di soluzione fisiologica. I beakers sono stati mantenuti alla temperatura di 4°C con ghiaccio. Il tessuto è stato omogeneizzato con un Heat Systems Sonicator (Modello W-10) agitando due volte per 30 secondi a un intervallo di 10 secondi. L'omogenato è stato poi centrifugato a 4°C per 15 minuti a 30.000 g. Il supernatante chiaro così ottenuto è stato utilizzato per l'analisi in malonildialdeide (MDA).

Saggio per l'MDA

Tutti i saggi sono stati condotti in doppio. Settecento microlitri di supernatante vengono aggiunti ad 1 ml di acido acetico glaciale e a 2 ml di acido 2-tiobarbiturico allo 0.5%; la miscela è stata poi mescolata con un agitatore a vortice. La miscela è stata bollita per 10 minuti, con la parte alta della provetta coperta da un tappo di marmo che fungeva da ricadere. Le provette sono state raffreddate con acqua corrente di rubinetto e lo sviluppo del colore è stato determinato con uno spettrofotometro a 531 nm. Le nanomoli di MDA prodotte sono state calcolate con la seguente formula:

$$\text{nanomoli di MDA} = \frac{\text{OD} \times V_f}{0,15}$$

Dove OD è la densità ottica a 531 nanometri. V_f è il volume finale della miscela, e 0,15 è il coefficiente di estinzione dell'MDA $\times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Con la stessa metodica sono state condotte le prove in bianco; 700 microlitri di acqua sono stati sostituiti all'omogenato. Le determinazioni di proteina di ciascun campione sono state eseguite utilizzando duecento microlitri del supernatante dei

We studied the effects of alpha-tocopheryl acetate at a 5% level in ethanol, 5% beta carotene in ethanol and a combination of both substances each at 2.5% level in a water in oil emulsion base. The 5% alpha-tocopheryl acetate and the 5% beta carotene produced a fifty percent reduction in MDA over the control site. The combination of the two ingredients at 2.5% each produced a similar decrease suggesting some synergism (A dosage response was not established in this study for these materials). (TAB. I-IV)

Discussion

The data suggests that the assay of MDA following UVB irradiation of the hairless

campioni stessi. È stato impiegato il metodo della micro proteina della Sigma (Sigma Technical Bulletin, 690).

Risultati

La figura 1 mostra il rapporto tra i dosaggi della radiazione ultravioletta e la quantità di MDA prodotta. Si verifica una risposta massima con una singola dose di 200 millijoules/cm² con una rapida caduta al di sopra di questo dosaggio. La figura 2 mostra il rapporto tra l'ammontare dell'MDA prodotto da una irradiazione di 200 milijoules/cm² in dipendenza del tempo. Il momento migliore per sacrificare gli animali è 9 ore dopo l'irradiazione, quando si voglia ottenere una produzione ottimale di MDA.

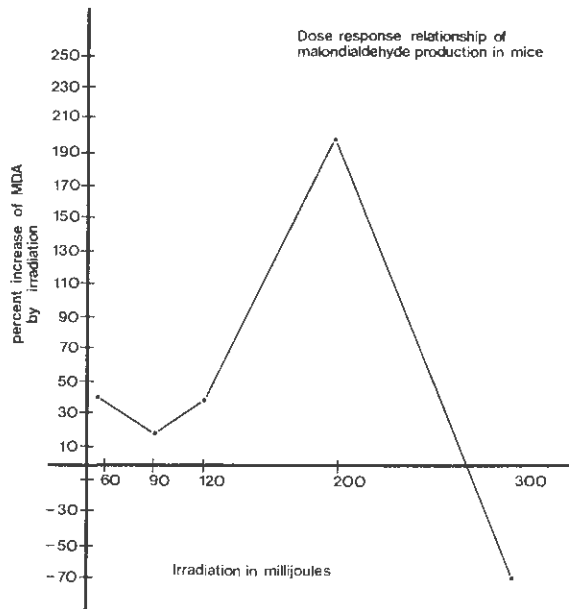


Fig. 1: Dose response relationship of malonyldialdehyde production in mice

Fig. 1: Risposta in rapporto alla dose della produzione di malonidialdeide nei topo

mouse is a sensitive method of determining the anti-oxidant effects of topically applied products. As a model system for evaluation the anti-aging effects of topical products this system depends on the validity of the free radical concept as a major etiological factor in aging. While there are other major causes of aging, the chief factor involved in free radical origin appears to be of environmental origin. Sunlight, ozone, nitrous oxide, along with a host of industrial pollutants are all capable of inducing free radical formation.¹⁴ These free radicals then forge the first link in the lipid peroxidation chain reaction.

The significance of lipid peroxidation in the aging process is based on the fact that lipofuscin pigments accumulate almost

Abbiamo studiato gli effetti dell'alfa tocoferil acetato al 5% in etanolo e di una combinazione di ambedue le sostanze ciascuna al 2,5% in una emulsione base di acqua in olio. L'alfa tocoferil acetato al 5% e il beta carotene al 5% hanno prodotto una riduzione dell'MDA del 50% nell'area di controllo. La combinazione dei due ingredienti, ciascuno al 2,5%, ha prodotto una analoga diminuzione suggerendo così un qualche sinergismo. (In questo studio non è stata stabilita una risposta di dosaggio per questi materiali). (Tabelle I-IV)

Discussione

I dati suggeriscono che il saggio dell'M-

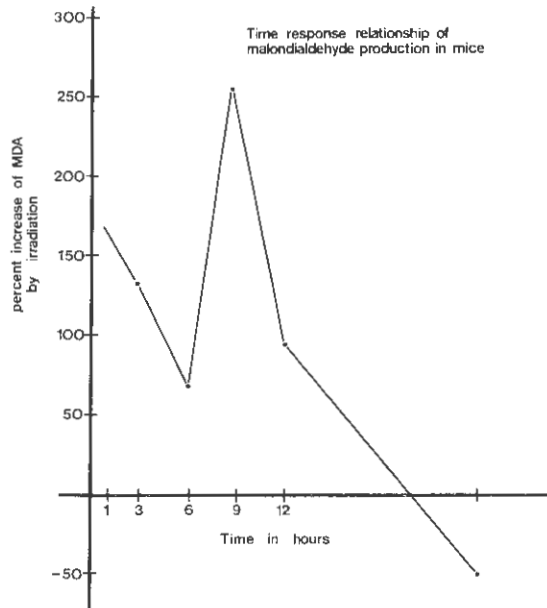


Fig. 2: Time response relationship of malonyldialdehyde production in mice

Fig. 2: Risposta in rapporto al tempo della produzione di malonildialdeide nel topo

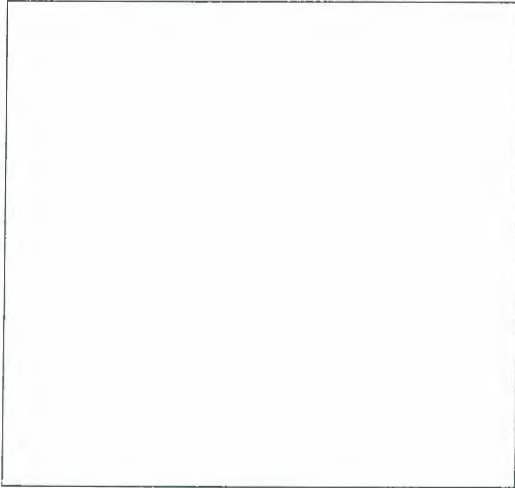
linearly with advancing age. (15) In addition these pigments result from polymerization of oxidized unsaturated lipid. Lipofuscin was first discovered in 1842, and in 1915 Ciaccio suggested the genesis of lipofuscin from unsaturated lipids based on histochemical studies. In animals molecular oxygen is the major element in lipid peroxidation even though biological reactions which use oxygen as a substitute are tightly controlled. These reactions involve the reduction of oxygen to water but because of the electronic nature of molecular oxygen partial reductions can and do occur. (16) Some of these partially reduced moieties include superoxide radicals, hydrogen peroxide, and other hydro-peroxides. The original of these deleterious end products can be xenobiotics, drugs and toxins as well as metabolites from the natural metabolic pathways. Biological systems that are exposed to uncontrolled oxygen radical flux suffer functional and structural damage that can ultimately result in cell death. (17,18)

A cosmetic product therefore that is capable of reducing lipid peroxidation can have a beneficial effect of the skin in regard to aging changes. Compounds such as alpha tocopheryl acetate and beta carotene are well suited to serve this function.¹⁹ There are other agents of course that may serve equally as well but the above two materials are both safe and effective.

DA a seguito di irradiazione con UVB del topo privo di peli è un metodo sensibile per determinare gli effetti antiossidanti di prodotti per applicazione topica. Questo sistema, come modello adatto per valutare gli effetti anti-invecchiamento dei prodotti topici, è connesso alla validità del concetto di radicale libero quale principale fattore eziologico dell'invecchiamento. Pur essendo altre le cause dell'invecchiamento, il fattore primario responsabile della formazione dei radicali liberi sembra essere di origine ambientale. La luce solare, l'ozono, il protossido d'azoto, insieme con una gran quantità di inquinanti industriali, sono tutti in grado di indurre la formazione di radicali liberi (14). Successivamente questi radicali liberi rappresentano il primo anello nella reazione a catena della perossidazione lipidica.

L'importanza della perossidazione lipidica nel processo di invecchiamento è rilevabile dalla constatazione che i pigmenti di lipofuscina si accumulano quasi linearmente con l'avanzare dell'età (15). Questi pigmenti, inoltre, sono il risultato della polimerizzazione di un lipide ossidato insaturo. La lipofuscina fu scoperta per la prima volta nel 1842, e nel 1915 Ciaccio ha suggerito la genesi della lipofuscina da lipidi insaturi, basandosi su studi istochimici. Negli animali, l'ossigeno molecolare è il principale responsabile della perossidazione lipidica anche se le reazioni biologiche che utilizzano l'ossigeno sono rigidamente controllate. Queste reazioni comportano la riduzione dell'ossigeno in acqua ma, a causa della natura elettronica dell'ossigeno molecolare, si possono verificare riduzioni incomplete, come in realtà avviene. Alcune di queste molecole parzialmente ridotte comprendono radicali perossidici, perossido di idrogeno, ed altri idro-perossidi. La fonte di questi prodotti finali pericolosi può essere costituita da xenobiotici, droghe e tossine





ed anche da metaboliti provenienti dai naturali cicli metabolici. I sistemi biologici esposti al flusso incontrollato di radicali ossigeno ne ricevono un danno funzionale e strutturale che può, da ultimo, portare alla morte stessa della cellula (17, 18).

Un prodotto cosmetico, perciò, che sia in grado di ridurre la perossidazione lipidica potrebbe svolgere effetti benefici sui processi di invecchiamento della cute. Composti quali l'alfa tocoferil acetato e il beta carotene sembrano idonei a svolgere questa funzione (19). Altri prodotti potrebbero servire allo scopo altrettanto bene, ma questi due principi attivi sono allo stesso tempo sia sicuri che efficaci.

REFERENCES

1. **Strehler, BL (1977)** Time, cells and aging 2nd edn. Academic Press, New York.
2. **Williams, GC (1957)** Pleiotrophy, natural selection and the evaluation of senescence. *Evolution* **11**: 398-411.
3. **Strehler, BL (1979)** Aging research: current and future. *J. Invest. Derm.* **73**: 2-7
4. **Jacob, F, Monod, J (1963)** Genetic Repression, allosteric inhibition and cellular differentiation, cyto-differentiation and macromolecular synthesis. Ed. Locke, M Academic Press
5. **Hirsche, GP, Strehler, B (1973)** Cross tissue translation capacities II relative effectiveness of heterologous synthesis (and other supernatant factors) in the translation of hemoglobin message. *Mech. Aging Dev.* **2**: 237-244
6. **Tauchi, H, Sato, J (1962)** Some micromeasuring studies of hepatic cells in senility. *J. Gerontol.* **17**: 254-260.
7. **Hayflick, L (1965)** The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37**: 614-636.
8. **Hayflick, L (1975)** Current theories of biological aging. *Fed. Proc.* **34**: 9-13
9. **Gershon, H, Gershon, D (1970)** Detection of inactive enzyme molecules in aging organism. *Nature* **227**: 1214-1217
10. **Rothstein, M (1975)** Aging and the alteration of enzymes. *Mech. Aging Dev.* **4**: 325-338
11. **Brandes, D et al. (1962)** Fine structure and histochemical study of the effect of castration on the rat prostate complex. *Lab. Invest.* **11**: 339-350
12. **Johnson, R, Chrisp, C, Strehler, B (1972)** Selective loss of ribosomal RNA genes during the aging of post-mitotic tissues. *Mech. Aging Dev.* **1**: 183-198
13. **Strehler, B (1978)** Roles and mechanisms of rDNA changes during aging. Birth Defects: Original Article Series of the *National Foundation* **14**(1): 449-462
14. **Pryor, WA (1976)** *Free radicals in biology*. Vol I Chap I, WA Pryor Ed. Academic Press, New York.
15. **Tappel, AL (1980)** Measurement of and protection from in vivo lipid peroxidation. *Free Radicals in Biology* Vol IV, edited by WA Pryor, Academic Press, New York.
16. **Foote, CS (1976)** Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. *Free Radicals in Biology* Vol II, edited by WA Pryor, Academic Press, New York
17. **Bus, JS, Gibson, JR (1979)** Lipid peroxidation and its role in toxicology. Reviews in *Biochemical Toxicology*, edited by E Hodgson, et al., Amsterdam, Elsevier.
18. **Hirai, S, et al. (1983)** Lipid peroxide in the aging process. *Lipid Peroxide in Biology and Medicine*, Academic Press, New York.
19. **Dixit, R et al. (1983)** Studies on the role of reactive oxygen species in mediating lipid peroxide formation in epidermal microsomes of rat skin. *J. Invest. Derm.* **81**: 369-375.