بررسی اثر عصاره هسته انگور بر لیپید پراکسیداسیون ناشی از ایسکمی/ هیپوپرفیوژن در بافت استریاتوم موش صحرایی نر

مریم رفیعی‌راد[۱]، علیرضا سرکاکی[۲*]، سید ابراهیم حسینی[۱]، یعقوب فربود[۲]، سید محمد تقی منصوری[۲]، فرشته معتمدی[۳]

۱ـ دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس، گروه زیست‌شناسی، فارس، ایران

۲ـ مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

۳ـ مرکز تحقیقات علوم اعصاب و شبکه علوم اعصاب ایران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

چکیده

ایسکمی مغزی منجر به مرگ نورونی در بخش‌های آسیب پذیر مغزی می‌شود که ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد و آسیب اکسیداتیو می‌باشد. در این مطالعه اثر تجویز خوراکی ۲۸ روزه‌ی عصاره‌ی هسته انگور(GSE) (۱۰۰ mg/pkg) بر استرس اکسیداتیو در مدل حیوانی ایسکمی هیپوپرفیوژن مزمن با قطع شریان‌های کاروتید عمومی دو طرفه (VO-۲) بررسی شد. تعداد ۳۰ سر موش صحرایی به گروه‌های کنترل، شاهد و ایسکمی تقسیم شدند. جهت ایجاد مدل ایسکمی شریان کاروتید عمومی دو طرفه جدا شده، از دو قسمت مسدود و از بخش میانی قطع شدند. و مغز تمامی موش‌ها جهت جدا سازی بافت استریاتوم و تست سنجش مالون دی آلدئید استخراج گردیدند . نتایج نشان داد که ایسکمی سبب افزایش اکسیدانتهای مغزی ازجمله لیپید پراکسیداسیون که یکی از عوامل ناشی از استرس اکسیداتیو می‌باشد گردید ($p<0.001$) و درمان متعاقب ایسکمی با GSE، لیپید پراکسیداسیون را در استریاتوم به طور معنی داری کاهش داد($p<0.001$). بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج اثر مصرف عصاره هسته انگور در این تحقیق، این ترکیب می تواند اثر جاروب کنندگی و حذف اکسیدان‌ها را در بافت‌های حساس مغزی ایفا کرده و عملکرد آنها را بهبود بخشد و بنابراین می‌تواند به عنوان روشی جهت درمان این بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ایسکمی مغزی، عصاره هسته انگور، لیپید پراکسیداسیون، استریاتوم

مقدمه

ایسکمی گلوبال مغزی حالتی است که ضمن آن خون و اکسیژن کافی به تمام یا بخش‌هایی از مغز نمی‌رسد و در نتیجه فعالیت طبیعی نورون‌ها مختل می‌شود [۱۶]. مدل ایسکمی با انسداد عروقی دوطرفه (VO-۲) تنها با بستن کاروتیدهای عمومی همراه است و باعث کاهش فشارخون در رت حدود تقریبا ۵۰ mmHg می‌شود و جریان خون فقط به ۱۵٪ سطح کنترل کاهش می‌یابد [۱۶]. انسداد شریان کاروتید عمومی دوطرفه دائمی (VO-۲) مدلی برای هیپوپرفیوژن مغزی مزمن است که با بیماریهای نورودژنرتیو در ارتباط است [۵]. در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرآیندها منجر به استرس اکسیداتیو و بروزتغییرات پاتولوژیک متعدد در سطح ماکرومولکول‌های سلولی می‌گردد [۱۱]. یک جنبه مخرب استرس اکسیداتیو تولید گونه‌های اکسیژنه واکنشی (ROS) است که شامل رادیکال‌های آزاد و پراکسیدها می‌باشد و کاهش آنها سبب افزایش طول عمر می شود.[۱۹]. اختلالات در حالت اکسیداسیون از اثرات سمی ناشی از تولید پراکسیدها و رادیکال‌های آزاد است که موجب آسیب همه اجزای سلولی، از جمله پروتئین‌ها ، لیپیدها، و

Archive of SID

www.SID.ir

DNA می‌باشد.[٦و٢٠]. لیپیدپراکسیداسیون به تخریب اکسیداتیو لیپیدها اشاره دارد. این روند موجب برداشت الکترون-های لیپیدی در غشاء سلولی توسط رادیکال‌های آزاد است که منجر به نقایص سلولی می‌شود. ROS لیپیدهای بسیار غیر اشباع را کاهش داده و مالون دی آلدئید (MDA) تشکیل می-دهد. مالون دی‌آلدئید ترکیب ارگانیک با فرمول $CH_2(CHO)_2$، یک آلدئید واکنشی است که به عنوان محصول نهائی لیپیدپراکسیداسیون معرفی می‌شوند [١٥].

عصاره دانه انگور حاوی طیف وسیعی از اثرات فارماکولوژیک و درمانی شامل فعالیت ضدالتهابی و کاهنده مرگ برنامه ریزی شده سلولی می‌باشد [٨]. عصارهٔ دانه انگور حاوی تعدادی از پلی‌فنول‌ها شامل پروسیانیدین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها بوده و جاروب کننده قوی رادیکالهای آزاد است [٢٢]. Hwang و همکارانش در سال ٢٠٠٤ گزارش داد که عصاره‌ی دانه انگور آسیب عصبی در جربیل‌های بالغ را بعد از ٥ دقیقه ایسکمی مغز کاهش داد [٩]. با توجه به یافته‌های گذشته بر آن شدیم تا اثر تجویز عصاره هسته انگور GSE را بر فاکتورهای ناشی از استرس اکسیداتیو همچون، لیپید پراکسیداسیون، در مدل حیوانی ایسکمی گلوبال دائمی با قطع شریان دو طرفه را در بافت استریاتوم بررسی کنیم.

مواد و روش کار

در این تحقیق موش‌های صحرایی (Rat) نر نژاد Wistar با وزن ٣٠٠g-٢٥٠ در زمان جراحی از مرکز تحقیقات، تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز خریداری شدند و قبل از انجام اعمال جراحی به صورت ٥ سر در هر قفس در شرایط محیطی کنترل شده از نظر درجه حرارت $22\pm1^{o}C$، رطوبت ٦٠-٥٠ درصد و سیکل نوری ١٢ ساعت روشنایی و ١٢ ساعت تاریکی (از ٧ شب تا ٧ صبح) با دسترسی آزاد به غذا و آب (باستثناء زمان انجام آزمایشات) نگهداری شدند. بعد از انجام عمل جراحی روی حیوانات، به منظور جلوگیری از آسیب رساندن به یکدیگر به صورت انفرادی در قفس‌های پلی کربنات استاندارد نگهداری شدند. تمامی آزمایشات در طی فاز روشنایی (٨صبح تا ١٧ عصر) انجام و تست‌های انجام شده تا حد امکان در یک زمان معین در روزهای مختلف انجام گرفتند. حیوانات بطور تصادفی ساده به گروه‌های زیر تقسیم شدند:

گروه کنترل (سالم)(Con)

شاهد جراحی: بدون قطع شریان‌های کاروتید جراحی شدند و شامل زیر گروه‌های زیر بودند:

٢٨ روز عصاره هسته انگور دریافت کردند (Sh.Isch+GSE).

٢٨ روز حلال عصاره هسته انگور دریافت کردند (Sh.Isch).

گروه های ایسکمی مغزی:

٢٨ روز عصاره هسته انگور دریافت کردند (Isch+GSE).

٢٨ روز حلال عصاره هسته انگور دریافت کردند (Isch).

روش جراحی: حیوانات با کتامین و زیلازین (٥٠ میلیگرم و ٢٠ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. یک شکاف در وسط بخش شکمی پوست گردن ایجاد گردید و بافت چربی زیر پوستی برداشته شده و از غده تیروئید دور گردید. شریان کاروتید پس از مشاهده و آشکار شدن از بافت های اطراف دور نگهداشته شد. در موش صحرایی شریان کاروتید عمومی بوسیله ابزارهای بخیه ی پوستی با گره محکم در حول رگ مسدود شدند و سپس قطع گردید. در موش‌هایی که به عنوان شاهد جراحی ایسکمی استفاده شدند، روش مشابه جراحی صورت می گرفت ولیکن انسداد شریانی انجام نمی شد. در ادامه پس از به هوش آمدن حیوانات و بعد از یک هفته، جراحی مشابهی در طرف دیگر انجام می‌شد[٣].

آماده‌سازی عصاره دانه انگور: انگور قرمز (محصول باغات قزوین) به صورت شاخه‌های بزرگ با دانه‌های قرمز از میدان میوه و تره‌بار اهواز در انتهای فصل تابستان خریداری شده و توسط کارشناسان دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز بعنوان Vitis vinifera L مشخص شدند. هسته‌های جداشده در هوای آزاد و در سایه به مدت یک هفته خشک شدند. پس از خشک شدن هسته‌ها مقدار مورد نظر توزین و

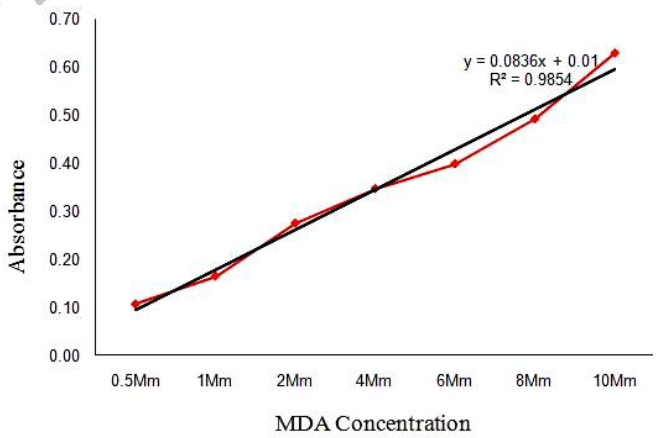
Archive of SID

www.SID.ir

توسط آسیاب برقی به پودر بسیار ریز (با قطر کمتر از0.4mm) تبدیل شدند. پودر دانه انگور سپس به مدت ۷۲ ساعت در اتانول ۷۰ درجه و در دمای اتاق خیسانده شد. مخلوط پودر دانه انگور و الکل هر روز به اندازه کافی و در چندین نوبت به هم زده شد. در پایان ۷۲ ساعت مخلوط الکل و پودر دانه انگور از صافی‌های ریزی عبور داده شده تا عصاره‌ی آن بدست آید. عصاره‌ی بدست آمده در خلأ تحت تقطیر قرار گرفت تا الکل آن به طور کامل تبخیر شد. در پایان پس از تبخیر الکل عصارهٔ دانه انگور به صورت پودر قهوه‌ای رنگ با بلورهای شفاف بدست آمد. درصد عصاره‌ای که از این روش به دست آمد حدود ۲۷-۲۵ درصد (نسبت به وزن دانه) بود. مقدار عصاره (۱۰۰ mg/pkg) [۷] در سرم فیزیولوژی حل شده و سپس به صورت خوراکی از طریق گاواژ به مدت ۲۸ روز تجویز گردید[۷و۱].

سنجش مالون دی آلدئید(MDA): در این آزمایش از گروه های ٦ تایی موش استفاده شد. بافت استریاتوم وزن شده و با ازاء هر ۱ گرم بافت ۱۰ میلی لیتر محلول ۱/۵٪ KCL اضافه شد و هموژن گردید. از محلول هموژن شده ۰/۵ میلی لیتر برداشته شده و ۲/۵ میلی لیتر TCA ۳٪ اضافه شد و مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه نگهداری شد. سپس ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی بعد از سانتریفیوژ برداشته شد و به هر یک ۳ میلی‌لیتر محلول ۱٪ اسید فسفریک و ۱ میلی لیتر محلول ۰/٦۷٪ TBA اضافه شده و ٤٥ دقیقه در آب جوش قرار گرفتند. لوله ها در ظرف یخ خنک شدند و به هر یک ٤ میلی‌لیتر بوتانول اضافه شد. بعد از ورتکس کردن، در ۳۵۰۰ دور بطور لحظه‌ای سانتریفیوژ شده و در نهایت جذب در طول موج ۵۳۲nm خوانده شد[١٤]. و پس از قراردادن اعداد حاصل از اسپکتروفتومتری و جذب در معادله خطی منحنی استاندارد میزان غلظت MDA بر اساس (nmol/g/ wet tissue) مورد ارزیابی فرار گرفت.

منحنی استاندارد: در ابتدا باید منحنی استاندارد رسم می‌شد که لازم بود محلول استاندارد MDA تهیه شده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، طول موج‌ها اندازه گیری می‌شد. ۰/۵ میلی لیتر از محلول استاندارد با غلظت های ۰/۵ ، ۱، ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ میکرومولار برداشته شد. سپس ۳ میلی لیتر محلول ۱٪ اسید فسفریک اضافه شد. و بقیه مراحل همچون مراحل قبل انجام گردید.



نمودار ۱- منحنی استاندارد

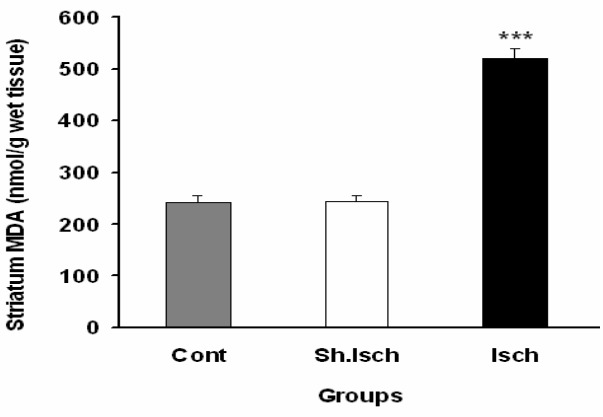
Archive of SID

www.SID.ir

روش‌های آماری: داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار از میانگین $(Mean \pm SEM)$ بیان شده‌اند. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 18) تجزیه و تحلیل شدند. برای بررسی نتایج در گروههای مختلف از آزمونهای ANOVA, یک طرفه و Post hoc ، LSD استفاده شده است. در تمام موارد اختلاف بین گروهها با $P<0.05$ معنی‌دار محسوب شده است.

نتایج

مقایسه میانگین مالون دی آلدئید (MDA) بین گروه‌های کنترل، ایسکمی و شاهد ایسکمی پس از ۲۸ روز نشان میدهد که افزایش معنی داری در مالون دی آلدئید،($p< ۰.۰۰۱$) در گروه ایسکمی نسبت به دو گروه دیگر مشاهده می شود. و بین گروه کنترل و شاهد ایسکمی استریاتوم، تفاوت معنی داری مشاهده نمی شود. با توجه به اینکه بین گروه شاهد ایسکمی و کنترل تفاوت معنی داری وجود نداشت از تکرار گروه کنترل در منحنی دیگر صرفنظر نمودیم (نمودار ۲). و در بخش دیگر تحقیق سنجش مالون دی آلدئید (MDA) بین گروه‌های شاهد ایسکمی دریافت کننده حلال GSE ، ایسکمی که GSE و گروه ایسکمی که حلال GSE را بمدت ۲۸ روز متوالی روزانه یک بار بصورت خوراکی (گاواژ) دریافت کردند نشان می دهد که، مالون دی آلدئید، ($p< ۰.۰۰۱$) در گروه ایسکمی که GSE دریافت کرده است کاهش معنی داری نسبت به گروه ایسکمی دریافت کننده حلال GSE داشته است (نمودار ۳). و GSE بر روی موش های سالم اگر چه سبب کاهش مالون دی آلدئید گردید اما این کاهش معنی‌دار نبود (نمودار ٤).

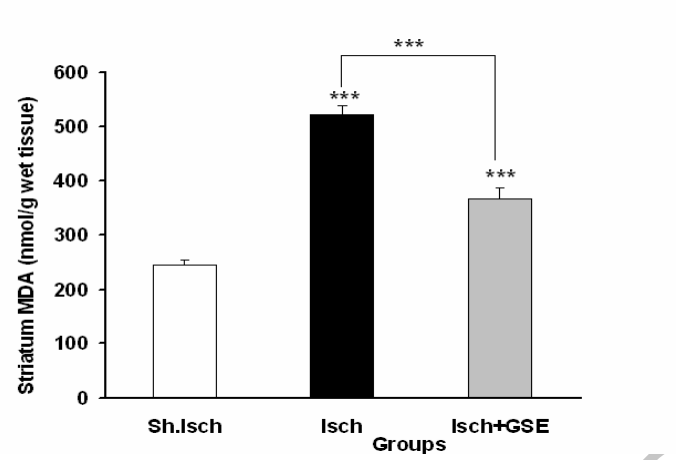


نمودار ۲: مقایسه میانگین ± انحراف معیار از میانگین مالون دی آلدئید (MDA) درون استریاتوم بین گروه‌های کنترل، شاهد ایسکمی و ایسکمی

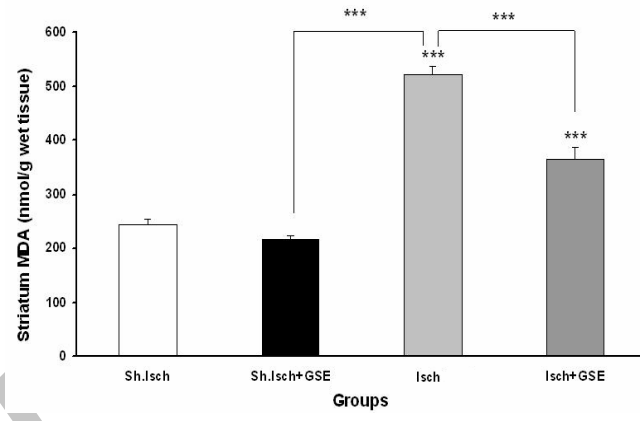
(one-way ANOVA-Post Hoc LSD test, n=6, *P<0.05,**P<0.01, ***P<0.001)

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۳: مقایسه میانگین ± انحراف معیار از میانگین مالون دی آلدئید (MDA) درون بافت استریاتوم بین گروه‌های شاهد ایسکمی، ایسکمی دریافت کننده حلال GSE و ایسکمی دریافت کننده GSE
(one-way ANOVA-Post Hoc LSD test, n=6, *P<0.05,**P<0.01, ***P<0.001)



نمودار٤: مقایسه میانگین ± انحراف معیار از میانگین مالون دی آلدئید (MDA) درون بافت استریاتوم بین گروه های شاهد ایسکمی، شاهد ایسکمی دریافت کننده GSE ، ایسکمی دریافت کننده حلال GSE و ایسکمی دریافت کننده GSE
(one-way ANOVA-Post Hoc LSD test, n=6, *P<0.05,**P<0.01, ***P<0.001).

بحث

در ایـن مطالعـه، اثـرGSE بـر وضـعیت آنتـی اکـسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی در مدل حیوانی ایسکمی مورد بررسـی قـرار گرفـت. در نتـایج مـا میـزان مـالون دی آلدئیـد (MDA) افزایش معنی داری در استریاتوم (p<0.001) در گروه ایسکمی نسبت به دو گروه سالم شاهد و کنترل نشان داد و مشاهدات مـا نشان داد کـه مـالون دی آلدئیـد در بافـت اسـتریاتوم درگـروه ایـسکمی کـه بـا GSE درمـان شـدند کـاهش معنـی داری (p<0.001) نسبت به گـروه ایـسکمی دریافـت کننـده حـلال GSE داشت. با توجه بـه اینکـه در مطالعـات نـشان داده شـده

www.SID.ir

اثرات درمانی عصاره هسته انگور ناشی از ترکیبات آنتی اکسیدانی آن است، لذا نتایج مشاهده شده احتمالا ناشی از این مواد در عصاره می باشد. تولید ROS و بوجود آمدن استرس اکسیداتیو عامل شناخته شده‌ای در اختلال عملکرد مغزی بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله ایسکمی می باشد. ایسکمی مغزی سبب راه اندازی آبشار سیگنالی می شود که بسته به مدت و شدت عارضه منجر به تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو می گردد[۱۶] و باعث اکسیده شدن لیپیدها و پروتئین ها در سیستم اعصاب مرکزی شده و آسیب سلولی را به دنبال خواهد داشت و تفاوت مقدار ROS تولیدی در هر نقطه از مغز شاید به میزان مصرف اکسیژن آن ناحیه مربوط باشد[۲]. و استریاتوم و هیپوکامپ از نواحی بسیار حساس به کمبود اکسیژن می‌باشند[۲۱]. استرس اکسیداتیو نه تنها باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود بلکه باعث کاهش مکانیسم‌های آنتی-اکسیدانی سلولی می‌شود[۱۵]. بررسی استرس اکسیداتیو، به کمک شاخص‌های متفاوتی صورت می‌گیرد که یکی از آنها محصولات نهایی لیپید پراکسیداسیون (MDA) است. تولید این آلدئید در یک ارگانیسم بیومارکری برای اندازه گیری سطح استرس اکسیداتیو است. MDA با تیوباربیتوریک اسید (TBA)، یک مشتق قرمز فلوئورسنت می‌دهد که با اسپکتروفتومتر قابل سنجش است[۱۵].

تحقیقات اخیر به تأثیر استفاده از آنتی‌اکسیدانها در درمان اختلالات سیستم عصبی و احیاناً ایسکمی متمرکز شده‌اند. این امر بر پایه این فرض است که اگر استرس اکسیداتیو در هنگامی که عدم تعادل بین تولید رادیکال آزاد و در دسترس بودن آنتی‌اکسیدانها وجود دارد رخ می‌دهد، پس تجویز اکسیدانت مکمل ممکن است جهت جاروب کردن رادیکالهای آزاد مورد استفاده قرار گیرد و توسعه بیماری، پیشرفت و یا هر دو آنها را تغییر دهد. اخیراً سلامت غذا یا مکمل‌های غذایی توجه بسیاری از افکار عمومی را بخود جلب نموده است. عصاره‌ی دانه انگور در ایالات متحده بعنوان یک مکمل غذایی در بازار وجود دارد و مدارکی دال بر سلامت آن وجود داشته و به آسانی در دسترس قرار دارد. گزارش شده که عصاره دانه انگور حاوی طیف وسیعی از اثرات فارماکولوژیک و درمانی شامل اثرات ضدالتهابی و کاهنده مرگ برنامه ریزی شده سلولی می‌باشد. [۸].علاوه براین اثر آنتی اکسیدانی GSE مؤثرتر از تجویز ویتامین E در موش گزارش شده است [4] .Morin و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان داد که پروآنتوسیانیدین های دانه انگور دارای توانایی محافظتی قابل توجهی در برابر آسیب اکسیداتیو در لکوسیت ها در شرایط in vitro هستند [12]. نتایج vigna و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۳ نشان داد که مکمل عصاره هسته انگور به طور قابل توجهی غلظت مالون دی آلدئید را در مرد های سالم و سیگاری کاهش داد[24] . همچنین گزارش شده که عصاره آبی دانه‌ی انگور دارای خواص ضد استرس، آنتی‌اکسیدان و افزایش دهنده فعالیت حافظه می‌باشد[۲۲]. در مطالعه Li و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در مورد اثر آنتی‌اکسیدانی ماده موثره‌ی عصاره دانه انگور(اسید گالیک) در موش‌های سوری پیر، نشان داد که اسید گالیک باعث کاهش معنی دار MDA در مغز این موش ها شده است[۱۰]. این نتایج با نتایج ما همخوانی دارد در حالیکه GSE اثری بر استرس اکسیداتیو و لیپید پراکسیداسیون در موش های دیابتی نوع ۲ نداشته است[17]. دلایل تفاوت بین مطالعه ما با سایر تحقیقات را می توان تفاوت در دوز مصرف عصاره، بافت انتخاب شده جهت مطالعه و طول مدت مطالعه برشمرد .از سوی دیگر Nahed و همکارانش در ۲۰۱۰ نشان دادند، تجویز خوراکی GSE منجر به بهتر شدن لیپیدپراکسیداسیون و آنزیم های آنتی‌اکسیداتیو گردید و سرعت همولیز در طی دوره‌ی درمان با GSE به حالت عادی بازگشت[۱۳]. نتایج اثرات قرص‌های حاوی عصاره دانه انگور کاهش قابل توجهی در سطح LDL – MDA را نشان می‌دهد که ممکن است در جلوگیری از بیماری تصلب شرایین مفید باشد[18] .GSE فعالیت‌های قوی آنتی‌اکسیدانی را با به دام انداختن مولکول‌های رادیکال آزاد (هیدروکسیل، رادیکال آزاد چربی، مولکولهای آهن و پراکسیدهای لیپیدی) و تاخیر انداختن اکسیداسیون لیپیدی،

Archive of SID

www.SID.ir

مهارماده اصلی مسئول تولید اکسیژن مشتق از رادیکال هـای آزاد و کاهش غلظت H_2O_2 تولید شده توسط استرس اکـسیداتیو را نشان می دهد[۲۳]. اختلالات عملکردی متعاقب ایـسکمی مغـز عمدتا ناشی از صدمات ایجاد شده برسلول‌های مغزی بـه علـت مواد اکسیدانی تولید شده می‌باشد. بنابراین عصاره دانه انگور بـا توانایی بالای حذف مـواد اکـسیدانی از نـواحی خـاص و مهـم مغزی موجب این اثر بهبـودی و کـاهش اسـترس اکـسیداتیو در مدل ایسکمی هیپوپرفیوژن شده است.

منابع

1. Badavi M. Sarkaki A., Dianat M., Gharibnaseri MK., Rahim F. (2008) Effect of grape seed extract on lead induced hypertension and heart rate. *Pak J Biol Sci*. 15;11 (6):882-7
2. Balu M., Sangeetha P., Murali G., Panneerselvam C. (2005) Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grapeseedextract.*Int J Dev Neurosci*; 23(6): 501-7.
3. Cristina S, Leonardo P, Luciano Bartolini, Domenico I .(2002) Persistent impairment of gait performances and working memory after bilateral common carotid artery occlusion in the adult Wistar rat, *Behavioural Brain Research*;136: 13_20
4. Enginar H, Cemek M, Karaca T, Unak P (2007). Effect of grape seed extract on lipid peroxidation, antioxidant activity and peripheral blood lymphocytes in rats exposed to x-radiation. *Phytother. Res.,* 21:1029-1035.
5. Eszter F, Paul G.M. , Luitenb, Ferenc B. (2007) Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases *Brain Research Review* S 5 4 ; 1 6 2 – 1 8 0
6. Evans MD, Cooke MS (2004). Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays* 26 (5): 533–42.
7. Farbood Y**,** Sarkaki A, Badavi M. (2009) Preventive effect of grape seed hydroalcholic extract on dementia type of Alzheimer's disease in aged male rats. *Int.J.Pharmacol*.;5(4), 257-262.
8. Feng Y, Liu YM, Fratkins JD, LeBlanc MH. (2005) Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res Bull*. 30;66(2):120-7.
9. Hwang IK, Yoo KY, Kim DS, Jeong YK, Kim JD, Shin HK, Lim SS, Yoo ID, Kang TC, Kim DW, Moon WK, Won MH. (2004) Neuroprotective effects of grape seed extract on neuronal injury by inhibiting DNA damage in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Life Sci.* 3; 75(16):1989-2001.
10. Li L, Ng TB, Gao W, Li W, Fu M, Niu SM, et al.(2005) Antioxidant activity of gallic acid from rose senescence accelerated mice. *Life Sci*.; 77; 230-40
11. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. (1994) Importance of Se glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-S.O.D., for cell cervival against oxidative stress.*Free Radic Biol Med*; 17: 235-48.
12. Morin B, Narbonne JF, Ribera D, Badouard C, Ravanat JL (2008). Effect of dietary fat-soluble vitamins A and E and proanthocyanidinrich extract from grape seeds on oxidative DNA damage in rats. *Food Chem. Toxicol*., 46: 787-796.
13. Nahed S. Hassan, Bassem M. Raafat and Samir W. Aziz. (2010) Modulator Role of Grape Seed Extract on Erythrocyte Hemolysis and Oxidative Stress Induced by Microwave

Archive of SID

www.SID.ir

Irradiation in Rats. *New York Science Journal*.;3(6)

14. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*; 95: 351-358
15. Osman Ac¸ikgo z , Sevil Go nenc, Berkant Muammer Kayatekin , Nazan Uysal , ¸etin Pekc¸ Ilgi S¸emin , Ataman Gure. (1998) Methamphetamine causes lipid peroxidation and an increase in superoxidedismutase activity in the rat striatum *Brain Research* 813. 200–202
16. Peter L. (1999) Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiological Reviews.* Vol. 79(4), 1431-1568
17. Pourghassem GB, Abedini S., Babaei H, Aliasgarzadeh A, Pourabdollahi P. (2011). Effect of supplementation with grape seed *(Vitis vinifera)* extract on antioxidant status and lipid peroxidation in patient with type II diabetes. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(10), pp. 2029-2034.
18. Sano A, Uchida R, Saito M, Shioya N, Komori Y, Tho Y, Hashizume N. (2007). Benefcial effects of grape seed extract on malondialdehyde-modifed LDL. *J Nutr Sci Vitaminol* 53(2):174-82
19. Sanz A, Fernández-Ayala DJ, Stefanatos RK, Jacobs HT.（2010）Mitochondrial ROS production correlates with, but does not directly regulate lifespan in Drosophila. *Aging (Albany NY)*.;2(4):200-23.
20. Sanz A, Stefanatos RK.（2008）The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view. *Curr Aging Sci.*;1(1):10-21.
21. Shukitt-Hale Barbara, Carey Amanda, Simon Laura, Mark David A. (2005) Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. Basic nutritional investigation. 23;295–302
22. Sreemantula S, Nammi S, Kolanukonda R, Koppula S, Boini K.M.(2005) Adaptogenic and nootropic activities of aqueous extract of Vitis vinifera (grape seed): an experimental study in rat model. Complement *Altern Med*.; 5(1): 1-8.
23. Sugisawa A, Inoue S, Umegaki K. (2004) Grape seed extract prevents $H_{(2)}O_{(2)}$-induced chromosomal damage in human lymphoblastoid cells. *Biol Pharm Bull.;* 27(9): 1459-61.
24. Vigna GB, Costantini F, Aldini G, Carini M, Catapano A, Schena F, Tangerini A, Zanca R, Bombardelli E, Morazzoni P, Mezzetti A, Fellin R, Maffei FR (2003). Effect of a standardized grape seed extract on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in heavy smokers. *Metab*., 52: 1250-1257.

Archive of SID

www.SID.ir