

اثر آب انگور قرمز بر یادگیری و حافظه‌ی احترازی غیرفعال در موش‌های صحرائی نر

محمد امامی^۱، علیرضا حسینی^۱، علی سعیدی^۱، دانیال گل بیدی^۱، دکتر پرهام رئیسی^۲، دکتر حجت ا... علایی^۳

خلاصه

مقدمه: مشخص شده است که یادگیری و حافظه، که از ضروریات بقا هستند، با افزایش سن دچار آسیب می‌شوند و این انگیزه‌ای را در عرصه‌ی پژوهش در طب سالمندان برای تحقیق در مورد کشف داروهای جدید مؤثر بر تقویت یادگیری و حافظه به وجود آورده است. با افزایش سن، تولید روزافزون استرس اکسیداتیو موجب آسیب فرآیندهای مغزی، از جمله اعمال شناختی، می‌گردد؛ این مطالعه قصد داشت با توجه به این که آب انواع مختلف انگور غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشند، اثر آب انگور قرمز (Red grape juice) را بر روی حافظه‌ی احترازی غیرفعال و یادگیری در رت‌های یک‌ساله مورد بررسی قرار دهد.

روش‌ها: تعداد ۲۰ سر موش صحرائی با وزن تقریبی ۲۷۰-۳۳۰ گرم در دو گروه شاهد و آزمون تقسیم شدند. هر دو گروه بدون هیچ محدودیتی به ظرف آب دسترسی داشتند؛ در گروه شاهد ظرف، حاوی آب خالص و در گروه آزمون ظرف، حاوی ۸۰ درصد آب خالص به همراه ۲۰ درصد آب انگور بود و هر روز محتویات ظروف برای جلوگیری از تغییر ترکیبات به صورت تازه تعویض می‌شد. آزمون یادگیری و حافظه‌ی احترازی غیرفعال در دستگاه یادگیری و پس از انجام تیمارهای مورد نظر برای همه‌ی گروه‌ها، با شرایط یکسان انجام شد. در این آزمون، افزایش تأخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک و مجموع زمان ماندن در اتاقک روشن و همچنین کاهش مجموع زمان ماندن در اتاقک تاریک بیان‌گر بهبود یادگیری و حافظه‌ی احترازی غیرفعال بود. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون غیر پارامتریک Mann-Whitney استفاده شد.

یافته‌ها: در مقایسه با گروه شاهد، شاخص‌های یادگیری و حافظه‌ی احترازی غیرفعال در گروه آزمون افزایش چشم‌گیری یافته بود.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان می‌دهد آب انگور قرمز سبب بهبود یادگیری و حافظه‌ی احترازی غیرفعال در رت‌ها می‌شود و احتمال می‌رود این اثر مربوط به وجود مواد آنتی‌اکسیدانی در آن باشد.

واژگان کلیدی: آب انگور قرمز، رت، یادگیری، حافظه‌ی احترازی غیرفعال.

^۱ دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۲ استادیار فیزیولوژی پزشکی، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۳ استاد فیزیولوژی پزشکی، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حجت ا... علایی، استاد فیزیولوژی پزشکی، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. E-mail: alaei@med.mui.ac.ir

Effect of Red Grape Juice on Learning and Passive Avoidance Memory in Rats

Mohammad Emami^{*}, Alireza Hosseini^{*}, Ali Saeedi^{*}, Danial Golbidi^{*},
Parham Reisi PhD^{**}, Hojjatallah Alaei PhD^{***}

Abstract

Background: Along with increased age, learning and memory being two of the survival necessities decrease and may even deteriorate. This has motivated researches in the field of geriatric medicine to find new medicines effective on learning and memory amplification. Studies have shown that through advanced age, increased oxidative stressors lead to damaged brain processes including cognitive functions. Since types of red grape juice contain antioxidants, this study aimed to examine the effect of this material on passive avoidance memory in 1-year old rats.

Methods: Twenty rats, each weighing about 270-330 g, were divided into two test and control groups. Both groups with no limitation had access to water vessel. In the control group, the water container contained pure water and in the test group it contained 80% pure water along with 20% grape juice. To prevent modification of ingredients, vessels contents were regularly refreshed. The passive avoidance memory and learning test was done in the learning device following intending treatments for all groups and in similar conditions. In this test, increased time delay for the first time of entry to the dark chamber and sum of the remaining time in the lighted chamber as well as decreased remaining time in the dark chamber indicate improved passive avoidance memory. To data analysis, the Mann-Whitney test was employed.

Findings: Compared with the control group, learning and passive avoidance memory indices had significantly increased in the test group.

Conclusion: Our results show that drinking grape juice causes increased learning and passive avoidance indices in rats; probably the reason was existence of antioxidant substances in the grape juice.

Keywords: Red grape juice, Rat, Learning, Passive avoidance memory.

^{*} Student, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

^{**} Assistant Assistant Professor of Medical Physiology, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

^{***} Resident Professor of Medical Physiology, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. Corresponding Author: Hojjatallah Alaei PhD, E-mail: alaei@med.mui.ac.ir

مقدمه

توان یادگیری و قدرت حافظه از ویژگی‌های بارز انسان است و برای ادامه‌ی حیات و گذران زندگی عادی و پیشرفت‌های علمی او ضرورتی اجتناب ناپذیر می‌باشد. افزایش شمار مبتلایان به اختلالات یادگیری و حافظه در دوران سالخوردگی، انگیزه‌ای را در عرصه‌ی پژوهش در طب سالمندان برای تحقیق در مورد کشف داروهای جدید مؤثر بر تقویت یادگیری و حافظه و پیش‌گیری کننده‌ی اختلالات آن به وجود آورده است (۱). از این رو در سال‌های اخیر استفاده از طب گیاهی و داروهای طبیعی، برای درمان فراموشی و تقویت حافظه، موضوع بسیاری از پژوهش‌های علوم پزشکی بوده است.

گیاهان دارویی مختلفی برای تقویت حافظه و درمان فراموشی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که از آن میان می‌توان به زعفران (Saffron) (۲)، زنجبیل (Ginger) (۳)، جینکوبیلوبا (Ginkobiloba) (۴)، سنا (Senna) (۵) و کندر (Frankincense) (۶) اشاره کرد.

به تازگی مشخص شده است که آب انگور نیز دارای اثرات مطلوبی بر فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند کنترل مراحل اولیه‌ی کانسر (۷)، تجمع پلاکتی و دیگر ریسک فاکتورهای آترواسکلروز (۸)، کاهش فعالیت فیزیکی و هوش با افزایش سن (۹)، هیپرتانسیون در انسان (۱۰) و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم (۱۱) می‌باشد.

مشخص شده است که آب انواع مختلف انگور غنی از آنتی‌اکسیدان‌هایی شامل فنولیک‌ها، فلاونوئیدها و رسیراتول می‌باشد و به نظر می‌رسد بسیاری از کاربردهای درمانی که به آن نسبت داده می‌شود، ناشی از وجود همین ترکیبات می‌باشد (۱۲). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که رژیم‌های غذایی حاوی مقدار زیادی مواد پلی‌فنولی، سبب بهبود عملکرد حافظه

در رت‌های مسن شده است (۱۳-۱۴).

در مطالعات قبلی مشاهده شده است که با افزایش سن، تولید روزافزون ریشه‌های واکنش پذیر اکسیژن یا ROS (Reactive Oxygen Species) و استرس اکسیداتیو موجب فعالیت غیرعادی مغز می‌گردد (۱۵)؛ با توجه به این که آب انگور قرمز غنی از فنولیک‌ها، فلاونوئیدها و رسیراتول به عنوان مواد آنتی‌اکسیدان می‌باشد (۱۲) و این که افزایش وضعیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از اکسیداسیون پروتئین‌ها بر روی یادگیری و حافظه اثرات مطلوبی دارد (۴) و این مواد آنتی‌اکسیدانی تجمع یافته در بافت عصبی، عوامل مؤثری در جلوگیری و درمان اختلالات ناشی از آسیب اکسیداتیو هستند (۱۶)، ما در این مطالعه قصد داشتیم اثر آب انگور قرمز را بر روی یادگیری و حافظه‌ی احترازی غیر فعال رت‌ها بررسی نماییم. مطالعات بر روی مدل‌های حیوانی نشان دهنده‌ی تأثیرات بیولوژیکی فیتوکمیکال‌های موجود در میوه‌ها و سبزیجات بر آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد (۱۷).

روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش رت‌های نر از نژاد ویستار با وزن 30 ± 300 گرم بودند که به دو گروه ۱۰ تایی شاهد و آزمون تقسیم شدند. رت‌ها در شرایط سیکل تاریکی و روشنی به صورت ۱۲ ساعته و غذا بدون هیچ محدودیتی نگهداری شدند.

آب انگور قرمز (۱۱) از درختان انگور قرمز (*Vitis vinifera*) باغات جهاد دانشگاهی شهرستان بانه واقع در استان کردستان به دست آمده است.

هر دو گروه بدون هیچ محدودیتی به آب دسترسی داشتند؛ در گروه شاهد ظرف، حاوی آب خالص و در

اتاق باز بود، قرار داده می‌شد و تأخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک و مجموع زمان سپری شده در هر یک از اتاق‌های تاریک و روشن ثبت می‌گردید. سقف زمانی در این مرحله ۳۰۰ ثانیه بود و کلیه‌ی آزمایشات بین ساعت ۱۱-۸ صبح انجام گردید. طولانی‌تر بودن تأخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک و مجموع زمان سپری شده در اتاق روشن و همچنین کوتاه‌تر بودن مجموع زمان سپری شده در اتاق تاریک نشانه‌ی یادگیری و حافظه بهتر می‌باشد.

داده‌ها به وسیله‌ی آزمون غیر پارامتریک Mann-Whitney تحلیل و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید و $P < 0/05$ معنی‌دار محسوب شد.

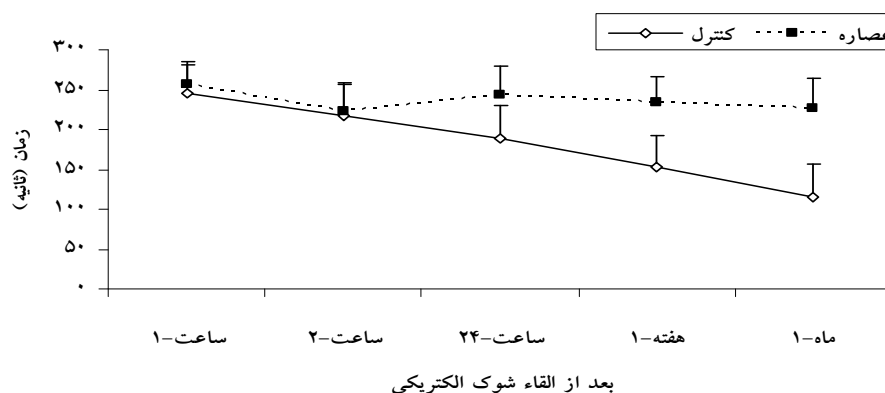
یافته‌ها

همان‌طور که در نمودار شماره‌ی ۱ مشاهده می‌شود، تأخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک بعد از اعمال شوک در گروه آزمون نسبت به گروه شاهد در تمام زمان‌ها بیشتر بود، ولی این افزایش تنها در زمان ۱ ماه بعد از اعمال شوک از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

گروه آزمون ظرف حاوی ۸۰ درصد آب خالص به همراه ۲۰ درصد آب انگور بود و روزانه ظروف برای جلوگیری از تغییر مواد محلول تعویض می‌شد.

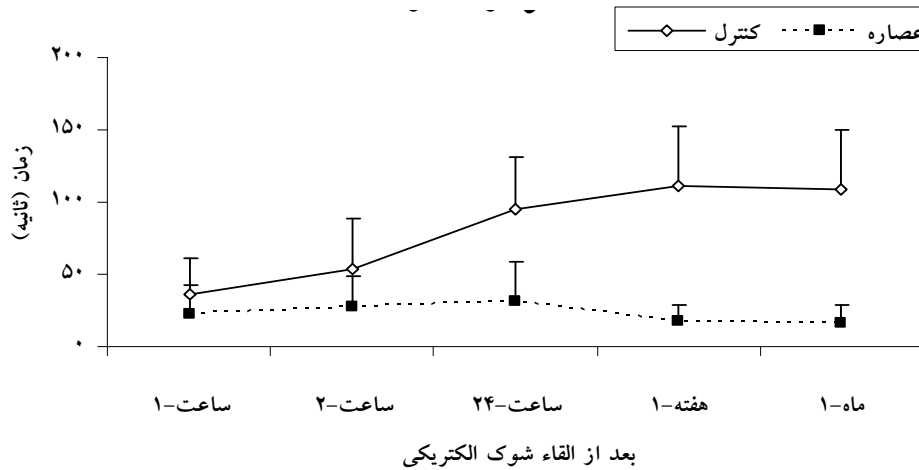
پس از مدت یک ماه (۱۸)، گروه‌ها به صورت رفتاری از لحاظ یادگیری و حافظه‌ی احترازی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

از روش یادگیری احترازی غیرفعال (Passive avoidance) به منظور بررسی یادگیری و حافظه استفاده گردید. دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال (Shuttle box) شامل دو بخش تاریک و روشن بود که توسط یک درب گیوتینی از هم جدا می‌شد. موش در حالی که پشتش به سمت در گیوتینی بود، در داخل اتاق تاریک گذاشته شده، ۵ ثانیه بعد درب گیوتینی بالا کشیده می‌شد. بعد از ورود موش به ناحیه تاریک در بسته و شوک الکتریکی با شدت ۱/۲ میلی‌آمپر به مدت ۵ ثانیه به کف پای حیوان اعمال می‌شد. پس از آن، حیوان از اتاق تاریک خارج و در قفس قرار داده می‌شد (۱۹). به منظور ارزیابی حافظه، ۱ ساعت، ۲ ساعت، ۲۴ ساعت، ۱ هفته و ۱ ماه بعد از دریافت شوک الکتریکی، حیوان دوباره در داخل اتاق روشن در حالی که دریچه‌ی بین دو

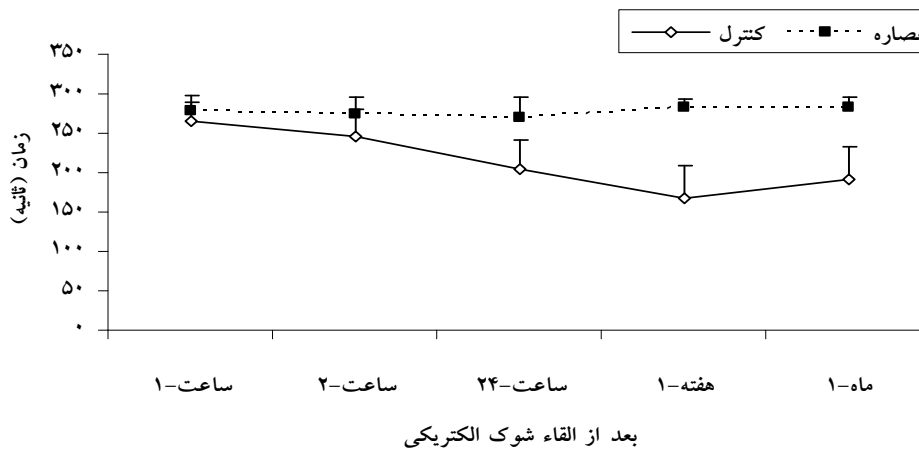


نمودار ۱. اثر آب انگور قرمز بر تأخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک؛ مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است.

$n = 10$ برای هر گروه و $P < 0/05$ در یک ماه پس از القای شوک



نمودار ۲. اثر آب انگور قرمز بر مجموع زمان سپری شده در اتاق تاریک؛ مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است. $n = 10$ برای هر گروه و $P < 0/05$ در یک ماه پس از القای شوک



نمودار ۳. اثر آب انگور قرمز بر مجموع زمان سپری شده در اتاق روشن. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است. $n = 10$ برای هر گروه و $P < 0/05$ در یک ماه و یک هفته پس از القای شوک

به گروه شاهد در تمام زمان‌ها بیشتر بود، ولی این افزایش تنها در زمان‌های ۱ هفته و ۱ ماه بعد از اعمال شوک از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

بحث

در این مطالعه اثرات آب انگور قرمز بر روی یادگیری و حافظه‌ی احترازی غیرفعال ارزیابی شد و نتایج نشان داد

طبق نمودار شماره‌ی ۲ مجموع زمان سپری شده در اتاق تاریک بعد از اعمال شوک در گروه آزمون نسبت به گروه شاهد در تمام زمان‌ها کمتر بود، ولی این کاهش تنها در زمان ۱ ماه بعد از اعمال شوک از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

طبق نمودار شماره‌ی ۳ مجموع زمان سپری شده در اتاق روشن بعد از اعمال شوک در گروه آزمون نسبت

که ممکن است در مغز در حال بلوغ افزایش یابد (۲۴). تفاوت مقدار ROS تولیدی در هر نقطه از مغز شاید به میزان مصرف اکسیژن آن ناحیه مربوط باشد (۱۶)، به همین دلیل هیپوکامپ و استراتیوم که مصرف اکسیژن بیشتری دارند (۲۵)، نسبت به مناطق دیگر مغز حساس‌ترند. اثر حفاظتی فلاونیدها وابسته به توانایی هیدروژن دهی آن‌ها، یا توانایی پاکسازی رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۲۶) و با توجه به وجود این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در آب انگور قرمز (۱۲)، این ترکیب می‌تواند به تمام سیستم‌های خنثی کننده‌ی رادیکال‌های آزاد کمک کند و با این مکانیسم احتمالی میزان ROS را در نواحی مختلف مغز رات‌ها کاهش دهد.

علاوه بر این، بر اساس مطالعات انجام گرفته، اکسیداسیون پروتئین‌ها که منجر به تغییرات بزرگی در ساختار پروتئین می‌گردد (۲۷)، در مناطق مختلف مغز، به خصوص هیپوکامپ و استراتیوم در رت‌های پیر به میزان قابل ملاحظه‌ای نسبت به رت‌های جوان بیشتر بوده است (۲۸، ۱۶)؛ با این حال، در مطالعات دیگر مشخص شده است در رت‌هایی که از عصاره‌ی انگور قرمز استفاده کرده‌اند، میزان اکسیداسیون پروتئین‌ها به شدت کاهش می‌یابد (۱۶). احتمال می‌رود این کاهش به دلیل پلی‌فنول‌های موجود در عصاره باشد که به طور مستقیم توانایی خنثی کردن ROS را دارند (۲۹-۳۰). این نتایج پیشنهاد کننده‌ی این موضوع است که آب انگور قرمز، به دلیل داشتن مواد آنتی‌اکسیدان (۱۲) می‌تواند به عنوان یک روش درمانی مناسب برای کاهش استرس اکسیداتیو در سیستم اعصاب مرکزی مورد توجه قرار گیرد.

در پایان پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، مواد مؤثره‌ی آب انگور به صورت اختصاصی بر روی

که کاربرد آن در رت‌های یک‌ساله موجب بهبود عملکرد حافظه در تست یادگیری احترازی غیرفعال می‌شود. این استدلال بر اساس افزایش تأخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک، افزایش مجموع زمان سپری شده در اتاق روشن و کاهش مجموع زمان سپری شده در اتاق تاریک در گروه آزمون نسبت به گروه شاهد به دست آمد.

با توجه به این که در مطالعات نشان داده شده است که اثرات درمانی آب انگور ناشی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد، احتمال می‌رود که نتایج مشاهده شده ناشی از مواد آنتی‌اکسیدانی آب انگور باشد. همچنین احتمال می‌رود که مشاهده‌ی بهبود حافظه در این تست ناشی از فنولیک‌ها، فلاونوئیدها و رسیراتول موجود در آب انگور قرمز باشد (۱۲). این نتایج هماهنگ با مطالعاتی است که نشان داده‌اند کاربرد طولانی مدت آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره‌ی دانه‌ی انگور آسیب‌های شناختی مرتبط با پیری را در حیوانات تخفیف می‌دهد (۲۰). مشخص شده است که در سنین پیری، تولید ROS و استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) حاصل از آن، در مکانیسم عملکرد غیرعادی مغز درگیر می‌باشد (۱۵). همچنین استرس اکسیداتیو در پیری به عنوان یک ریسک فاکتور در افزایش لیپیدها و پروتئین‌های اکسید شده در دستگاه عصبی مرکزی مطرح است و در نهایت موجب آسیب سلولی می‌گردد (۲۱)؛ مطالعات نشان داده است که میزان تولید این ROS ها در رت‌های پیر نسبت به جوان در مناطق مختلفی از مغز بسیار بیشتر است (۲۲). تولید رادیکال‌های آزاد در ارتباط با پروسه‌های طبیعی سلولی مانند متابولیسم سلولی، تنفس میتوکندریایی، فعالیت لیپواکسیژنازی و سیکلواکسیژنازی می‌باشد (۲۳)

مناطق حساس به استرس اکسیداتیو مغز (مانند هایپوکامپ) مورد بررسی قرار گیرد.

قسمت‌های مختلف سیستم عصبی مرکزی بررسی شود و همچنین اثرات مواد آنتی‌اکسیدانی آب انگور بر روی

References

1. Barnes CA. Memory changes during normal aging: neurobiological correlate. In: Marti'nez JL, Kesner RP, editors. Neurobiology of learning and memory. New York: Academic Press; 1998. p. 247-87.
2. Abe K, Saito H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. *Phytother Res* 2000; 14(3): 149-52.
3. Sheikhi A. Evaluation effect of different extracts of ginger on speed of learning and enhancement of memory in rat. [General Pharmacy Doctorate Thesis]. Isfahan: Isfahan University of Medical Sciences; 2000. [Persian].
4. Soholm B. Clinical improvement of memory and other cognitive functions by Ginkgo biloba: review of relevant literature. *Adv Ther* 1998; 15(1): 54-65.
5. Nwosu MO. Herbs for mental disorders. *Fitoterapia* 1999; 70(1): 58-63.
6. Hosseini Sharifabad M, Esfandiari E, Alaei H. Effects of frankincense aqueous extract during gestational period on increasing power of learning and memory in adult offspring. *Journal of Isfahan Medical School* 2004; 21(71):16-20.
7. Jung KJ, Wallig MA, Singletary KW. Purple grape juice inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. *Cancer Lett* 2006; 233(2): 279-88.
8. Shanmuganayagam D, Warner TF, Krueger CG, Reed JD, Folts JD. Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 2007; 190(1): 135-42.
9. Shukitt-Hale B, Carey A, Simon L, Mark DA, Joseph JA. Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. *Nutrition* 2006; 22(3): 295-302.
10. Park YK, Kim JS, Kang MH. Concord grape juice supplementation reduces blood pressure in Korean hypertensive men: double-blind, placebo controlled intervention trial. *Biofactors* 2004; 22(1-4): 145-7.
11. Wulf LW, Nagel CW. High-pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of vitis vinifera. *Am J Enol Vitic* 1978; 29(1): 42-9.
12. Yang J, Martinson TE, Hai Liu R. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry* 2009; 116(1): 332-9.
13. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(1 Suppl): 313S-316S.
14. Bastianetto S, Quirion R. Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiol Aging* 2002; 23(5): 891-897.
15. Schipper HM. Brain iron deposition and the free radical-mitochondrial theory of ageing. *Ageing Res Rev* 2004; 3(3): 265-301.
16. Balu M, Sangeetha P, Murali G, Panneerselvam C. Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract. *Int J Dev Neurosci* 2005; 23(6): 501-7.
17. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, et al. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci* 1999; 19(18): 8114-21.
18. Sarkak A, Farbood Y, Badavi M. The effect of grape seed extract (GSE) on spatial memory in aged male rats. *Pak J Med Sci* 2007; 23(4): 561-5.
19. Alaei H. Memory and related drugs to dopaminergic system in the brain. *Journal of Isfahan Medical School* 1996; 41: 1-9. [Persian].
20. Bickford PC, Gould T, Briederick L, Chadman K, Pollock A, Young D, et al. Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. *Brain Res* 2000; 866(1-2): 211-7.
21. Schoneich C. Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach. *Exp Gerontol* 1999; 34(1): 19-34.
22. Schreiber SJ, Megow D, Raupach A, Victorov IV, Dirnagl U. Age-related changes of oxygen free radical production in the rat brain slice after hypoxia: on-line measurement using enhanced chemiluminescence. *Brain Res* 1995; 703(1-2): 227-30.
23. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262(5134): 689-95.
24. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47(5): 412-26.
25. Floyd RA, Carney JM. Age influence on oxidative events during brain ischemia/reperfusion. *Arch Gerontol Geriatr* 1991; 12(2-3): 155-77.
26. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G.

Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20(7): 933-56.

27. Butterfield DA, Koppal T, Howard B, Subramaniam R, Hall N, Hensley K, et al. Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854: 448-62.

28. Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, et al. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation.

J Neurochem 1995; 65(5): 2146-56.

29. Ray SD, Patel D, Wong V, Bagchi D. In vivo protection of dna damage associated apoptotic and necrotic cell deaths during acetaminophen-induced nephrotoxicity, amiodarone-induced lung toxicity and doxorubicin-induced cardiotoxicity by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2000; 107(1-2): 137-66.

30. Sato M, Bagchi D, Tosaki A, Das DK. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. *Free Radic Biol Med* 2001; 31(6): 729-37.