

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ EKSTRESİNİN SIÇANLARDA AKUT VE
KRONİK EGZERSİZİN NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF HASAR
VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA ÜZERİNE ETKİLERİ**

Muaz BELVİRANLI

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof.Dr. Hakkı GÖKBEL**

KONYA-2009

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ EKSTRESİNİN SIÇANLARDA AKUT VE
KRONİK EGZERSİZİN NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF HASAR
VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA ÜZERİNE ETKİLERİ**

Muaz BELVİRANLI

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof.Dr. Hakkı GÖKBEL**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 08102008 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2009

ii. ÖNSÖZ

Akut ve kronik egzersizin neden olduğu oksidatif stres ve çeşitli antioksidanların takviyesinin bu oluşan oksidatif stres üzerine etkileri pek çok çalışmada araştırılmasına rağmen, E ve C vitaminleri gibi antioksidan etkinliği iyi bilinen maddelere kıyasla daha güçlü bir antioksidan olduğu iddia edilen üzüm çekirdeği ekstresinin egzersizin neden olduğu oksidatif stres üzerine etkisi henüz araştırılmamıştır. Ayrıca akut ve kronik egzersizin etkilerini antioksidan takviyesi ile bir arada araştıran fazla çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızın önemi, egzersizin neden olduğu oksidatif hasara karşı üzüm çekirdeği ekstresinin koruyucu rolünü araştıran çalışmanın bulunmaması ve bu çalışmanın bu alandaki ilk araştırma olmasıdır.

Bu tez çalışması Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje No: 08102008) tarafından desteklenmiştir.

Çalışmamda bilgi, tecrübe ve özverisiyle bana destek olan danışman hocam Prof.Dr.Hakkı GÖKBEL'e, tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr.Nilsel OKUDAN'a, laboratuvar çalışmalarında destek ve yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr.Sadık BÜYÜKBAŞ ve Dr.Kemal BAŞARALI'ya, istatistik analizlerin yapılmasında yardımcı olan Prof.Dr.Said BODUR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim süresince bilgilerinden yararlandığım Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof.Dr.Neyhan ERGENE, Prof.Dr. Hüseyin UYSAL, Doç.Dr. A. Kasım BALTACI, Doç.Dr.Rasim MOĞULKOÇ ve Doç.Dr. H. Serdar GERGERLİOĞLU'na teşekkür ederim. Ayrıca tezimin deneysel kısmında yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi personeline teşekkürlerimi sunarım.

ii. İÇİNDEKİLER

I. ÖNSÖZ	iii
ii. İÇİNDEKİLER	iv
iii. SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....	1
1.1.1. Serbest Radikallerin Biyokimyasal Özellikleri.....	1
1.1.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kontrollü Üretimi	3
1.1.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Kontrolsüz Üretimi	4
Oksijen metabolizmasında ROS oluşumu.....	4
İskemi-Reperfüzyon esnasında ROS oluşumu.....	4
Hemoglobin ve miyoglobin oksidasyonu esnasında ROS oluşumu	5
1.1.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Biyolojik Etkileri	6
Pozitif etkileri.....	6
Negatif etkileri	6
Lipid oksidasyonu	7
Protein oksidasyonu	7
DNA oksidasyonu	7
1.1.5. Serbest Radikallerin Kas Yorgunluğundaki Rolü	8
1.1.6. Antioksidanlar	9
Enzimatik antioksidanlar.....	11
Süperoksit dismutaz	11
Katalaz	11
Glutasyon peroksidaz	11
Enzimatik olmayan antioksidanlar	12
E vitamini (Tokoferol)	12
C vitamini (Askorbik asit).....	12
β-Karoten ve A vitamini	12
Flavonoidler	12
Thioller.....	13
Koenzim Q10	13
Ürik asit.....	13

Isı şok proteinleri	14
Ferritin.....	14
Albümin, bilirübin ve serüloplazmin	14
1.1.7. Oksidatif Stres ve Oksidatif Hasarın Tanımı	14
1.1.8. Biyolojik Sistemlerde Oksidatif Stresin Değerlendirilmesinde Kullanılan Metotlar	16
Serbest radikallerin direkt olarak tayini	16
Lipidler, proteinler ve DNA moleküllerinde oksidatif hasarın ölçümü	16
Lipid peroksidasyonu	16
Protein modifikasyonu	18
DNA modifikasyonu	19
Diğer indirekt oksidatif stres belirteçleri.....	19
Antioksidan ölçümleri.....	19
Enzimatik antioksidan aktivitesi	19
Antioksidan vitaminler.....	19
Diğer antioksidanlar	20
Total antioksidan kapasite.....	20
1.2. Egzersizde Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma	21
1.2.1. Akut Egzersizde Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma	22
Akut egzersizde oksidatif stres.....	22
Aerobik egzersizde oksidatif stres	22
Anaerobik egzersizde oksidatif stres.....	24
Aerobik-anaerobik karışık egzersizlerde oksidatif stres	26
Akut egzersizde antioksidan savunma: Antioksidan kısıtlamasının ve takviyesinin etkileri	26
Aerobik egzersizde antioksidan savunma	27
Anaerobik egzersizde antioksidan savunma	29
Aerobik-anaerobik karışık egzersizlerde antioksidan savunma.....	30
Antioksidan kısıtlamasının ve takviyesinin etkileri	30
1.2.2. Düzenli Egzersizde Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma	33
Düzenli egzersizde oksidatif stres.....	33
Aerobik antrenmanda oksidatif stres.....	33
Anaerobik antrenmanda oksidatif stres.....	34
Aerobik-anaerobik karışık antrenmanlarda oksidatif stres	35

Düzenli egzersizde antioksidan savunma: Antioksidan kısıtlamasının ve takviyesinin etkileri.....	35
Aerobik antrenmanda antioksidan savunma	35
Anaerobik antrenmanda antioksidan savunma.....	38
Aerobik-anaerobik karışık antrenmanlarda antioksidan savunma	38
Antrenman yükü ve oksidatif stres arasındaki ilişki	38
1.3. Üzüm Çekirdeği Ekstresi	39
1.3.1. Polifenoller ve Flavonoidlerin Genel Özellikleri.....	40
1.3.2. Polifenolik Bileşiklerin Sindirim ve Emilimi	42
1.3.3. Polifenolik Bileşiklerin Biyoyararlanımı ve Metabolizması	44
1.3.4. Polifenollerin Antioksidan Aktivitesi	45
1.3.5. Üzüm ve Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Genel Özellikleri	47
1.3.6. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Antikanser Ajanı Olarak Etkileri.....	47
1.3.7. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Antiinflamatuvar Ajan Olarak Etkileri	49
1.3.8. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri	50
1.3.9. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Antioksidan Aktivitesi.....	55
1.3.10. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Yan Etkileri ve Güvenilirliği.....	61
2. GEREÇ VE YÖNTEM	63
2.1. Hayvan Materyali ve Gruplar.....	63
2.2. Deney Hayvanlarının Bakımı ve Beslenmesi	64
2.3. Üzüm Çekirdeği Ekstresi Takviyesi.....	64
2.4. Egzersiz Protokolleri.....	66
2.4.1. Kronik Egzersiz Protokolü.....	67
2.4.2. Akut Egzersiz Protokolü	67
2.4.3. Kontrol Grubu	68
2.5. Çalışmanın Sonlandırılması ve Kan Örneklerinin Toplanması	68
2.6. Biyokimyasal Analizler.....	68
2.6.1. Kullanılan Cihazlar	68
2.6.2. Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler.....	69
MDA reaktifleri.....	69
NO reaktifleri	69
XO reaktifleri	69
ADA reaktifleri	69

SOD reaktifleri	70
GPx reaktifleri	70
2.6.3. Kullanılan Analiz Yöntemleri	70
Malondialdehit (MDA) ölçümü	70
Nitrik oksit (NO) ölçümü	71
Ksantin oksidaz (XO) ölçümü.....	71
Adenozin deaminaz (ADA) ölçümü.....	71
Süperoksit dismutaz (SOD) ölçümü	72
Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivite ölçümü.....	72
2.7. İstatistiksel Analizler.....	73
3. BULGULAR	74
3.1. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Vücut Ağırlığı Üzerine Etkileri	74
3.2. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Akut Egzersizde Tükenme Süresi Üzerine Etkisi..	75
3.3. Akut ve Kronik Egzersizde Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Belirteçleri Üzerine Etkileri.....	76
4. TARTIŞMA	81
4.1. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Vücut Ağırlığı Üzerine Etkileri	81
4.2. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Akut Egzersizde Tükenme Süresi Üzerine Etkisi..	84
4.3. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Akut ve Kronik Egzersizde Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Belirteçleri Üzerine Etkileri.....	85
4.3.1. MDA Değişiklikleri	85
4.3.2. XO Değişiklikleri	88
4.3.3. ADA Değişiklikleri	89
4.3.4. NO Değişiklikleri	90
4.3.5. SOD Değişiklikleri.....	91
4.3.6. GPx Değişiklikleri.....	93
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	96
6. ÖZET	98
7. SUMMARY	99
8. KAYNAKLAR	100
9. ÖZGEÇMİŞ	125

iii. SİMGELER ve KISALTMALAR

- 8-OHdG: 8-hidroksi-2-deoksiguanozin
ADA: Adenozin deaminaz
ALT: Alanin aminotransferaz
AST: Aspartat aminotransferaz
CAT: Katalaz
CK: Kreatin kinaz
GPx: Glutasyon peroksidaz
GR: Glutasyon redüktaz
GSE: Üzüm çekirdeği ekstresi
GSH: Glutasyon
GSSG: Redükte glutasyon
GST: Glutasyon S transferaz
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein
HOCL: Hipoklorik asit
HSP: Isı şok proteinleri
ICAM-1: İntersellüler adezyon molekülü-1
LDH: Laktat dehidrogenaz
LDL: Düşük dansiteli lipoprotein
MDA: Malondialdehit
NO: Nitrik oksit
ONOO⁻: Peroksinitrit
RNS: Reaktif nitrojen türleri
ROS: Reaktif oksijen türleri
RSS: Reaktif sülfür türleri
SOD: Süperoksit dismutaz
TBARS: Tiobarbütirik asit reaktif maddeler
VCAM-1: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VLDL: Çok düşük dansiteli lipoprotein
VO_{2max}: Maksimal oksijen kullanımı
XD: Ksantin dehidrogenaz
XO: Ksantin oksidaz

1. GİRİŞ

1.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

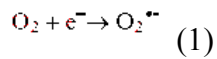
Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküllerdir (Jenkins 1988). Serbest radikaller, (a) radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektronun çıkmasıyla, (b) radikal olmayan bir atom veya moleküle bir elektronun ilavesiyle oluşurlar (Halliwell ve Gutteridge 2000).

Serbest radikaller arasında reaktif oksijen türleri (ROS) oksijen kaynaklıdır ve oksijenin reaktif formlarını içerirler (Çizelge 1.1) (Finaud ve ark 2006). Reaktif azot türleri (RNS) ve reaktif sülfür türleri (RSS) gibi serbest radikal türleri de mevcuttur (Çizelge 1.1). Bu türler ROS ile reaksiyon sonucunda oluşurlar veya ROS üretimini artırır (Giles ve Jakob 2002). ROS ve RNS, bütün aerobik organizmalar tarafından metabolik süreçlerin sonucu olarak üretilen serbest radikal ürünleridir (Halliwell ve Gutteridge 2000, Urso ve Clarkson 2003).

1.1.1. Serbest Radikallerin Biyokimyasal Özellikleri

Normal şartlarda, eksojen (radyasyon, hava kirliliği, sigara, alkol) ve endojen (oksijen metabolizması) kaynaklardan devamlı olarak ROS üretimi yapılır (Thomas 2000).

Normal şartlar altında metabolizması esnasında oksijen iki elektron alır. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle kararsız bir yapı olan süperoksit radikali oluşur (Eşitlik 1) (Sen 2001).



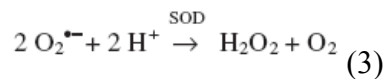
Fenton reaksiyonu hidrojen peroksidin demir tuzuna bağlı dekompozisyonudur ve sonuçta reaktif olan hidroksil radikali oluşur. Bu reaksiyon ferro iyonlarının (Fe^{+2}) ve $O_2^{\bullet -}$ 'nin varlığında gerçekleşir. Demir dokularda genel olarak ferrik iyon durumunda (Fe^{+3}) bulunur. Demirin bu dönüşüm reaksiyonu Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılır (Eşitlik 2d) (Finaud ve ark 2006).

- a $O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow O_2^*H$
- b $O_2^*H + O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- c $Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$
- d $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$ (2)

Çizelge 1.1. Serbest radikallerin sınıflandırılması ve temel etkileri (Finaud ve ark 2006).

Serbest Radikal	Kısaltması	Yarı Ömrü	Temel Etkisi
Reaktif Oksijen Türleri	ROS		
Süperoksit İyonu	$O_2^{\bullet-}$	10^{-5} saniye	Lipid oksidasyonu ve peroksidasyonu Protein oksidasyonu, DNA hasarı
Ozon	O_3	Stabil	
Singlet Oksijen	1O_2	10^{-5} saniye	
Hidroksil Radikali	OH^{\bullet}	10^{-9} saniye	
Hidrojen Peroksit	H_2O_2	Stabil	
Hipokloröz Asit	HOCL	Stabil	
Alkoksil Radikali	RO^{\bullet}	10^{-6} saniye	
Peroksil Radikali	ROO^{\bullet}	7 saniye	
Hidroperoksil Radikali	$ROOH^{\bullet}$		
Reaktif Azot Türleri	RNS		
Nitrik Oksit	NO^{\bullet}		Lipid peroksidasyonu Protein oksidasyonu, DNA hasarı
Nitrik Dioksit	NO_2^{\bullet}	1-10 saniye	
Peroksinitrit	$ONOO^{\bullet-}$	0.05^{-1} saniye	
Reaktif Sülfür Türleri	RSS		
Thiil Radikali	RS^{\bullet}		Protein oksidasyonu, DNA hasarı ROS üretimi

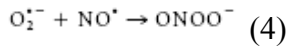
Eşitlik 3'te Fenton reaksiyonunun birinci ve ikinci basamakları özetlenmektedir. Asidik ortamda süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizlediği reaksiyon ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Diğer serbest radikallerin aksine, hidrojen peroksit hücre membranı boyunca taşınabilir (Kerksick ve ark 2005).



H₂O₂, eşlenmemiş elektrona sahip olmadığı için serbest radikal değildir ama toksisitesi ve ROS oluşumuna neden olmasından dolayı ROS olarak kabul edilmektedir (Finaud ve ark 2006). Lökositlerde bulunan miyeloperoksidaz (MPO) enzimi H₂O₂'yi en güçlü fizyolojik oksidanlardan biri ve güçlü bir mikrobiyal ajan olan hipoklorik aside (HOCL) dönüştürür (Hampton ve ark 1998).

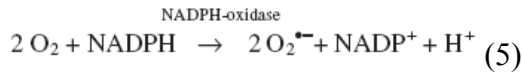
Hidroksil radikali (OH[·]) Fenton reaksiyonunun son ürünüdür (Eşitlik 2). OH[·] çok reaktif ve toksiktir ve bu serbest radikale özgün bir antioksidan henüz bulunmamıştır. Bu serbest radikal lipid peroksidasyonuna ve protein oksidasyonuna neden olur (Leeuwenburgh ve ark 1999).

Bir reaktif nitrojen türü olan nitrik oksit (NO[·]) de süperoksit ile reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO⁻) oluşumuna neden olabilir (Eşitlik 4). Peroksinitrit nispeten uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir ve membranları geçebilir (Leeuwenburgh ve Heinecke 2001).



1.1.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kontrollü Üretimi

Bağışıklık sisteminde nötrofiller ve makrofajlar NADPH-oksidadaz sistemini indirgeyerek O₂⁻ üretirler (Fehrenbach ve Northoff 2001). “Oksidatif patlama” olarak adlandırılan bu süreç (Eşitlik 5) için iki O₂ molekülüne ihtiyaç vardır.

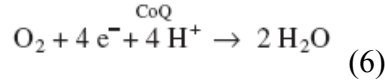


O₂⁻ Fenton reaksiyonunda SOD vasıtasıyla H₂O₂'ye dönüştürülür. H₂O₂ daha sonra antijen parçalanması için çok aktif olan HOCL'ye dönüşür (Aruoma 1999). Böylece, bağışıklık süreci esnasında önemli miktarda ROS oluşabilir ve homeostazisin kontrolünde önemli rol oynar (Hampton ve ark 1998, Fehrenbach ve Northoff 2001).

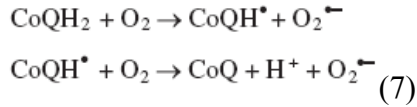
1.1.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Kontrolsüz Üretimi

Oksijen metabolizmasında ROS oluşumu

Solunum zincirinde tüketilen oksijenin % 95-99'u koenzim Q'nun katalizlediği tetravalent redüksiyon ile suya indirgenir (Eşitlik 6) (Sjödin ve ark 1990, Fehrenbach ve Northoff 2001).



Oksijenin % 1-5'i ise $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'ye dönüşür (Jenkins ve Goldfarb 1993). ROS oluşumu solunum zinciri aktivitesi ile orantılıdır ama daima oksijen alımı ile orantılı değildir (Di Meo ve Venditti 2001). Solunum zincirinde iki temel ROS üretim alanı bulunmaktadır: Kompleks I ve kompleks III (Sjödin ve ark 1990, Lenaz 1998). Bu kompleksler içerisindeki ROS üretiminin miktarı ve dağılımı ATP ihtiyacına, oksijen alımına ve vücut sıcaklığına göre değişir (Di Meo ve Venditti 2001). Kompleks I ve III içerisinde redükte koenzim Q10 (CoQH_2) ROS oluşumuna katkıda bulunur (Eşitlik 7) (Nohl ve Jordan 1986).



Hem in vitro hem de in vivo çalışmalar, mitokondriyal solunum zincirinin istirahat ve egzersiz sırasında sadece çalışan kaslarda değil, kısmi iskemiye maruz kalan çalışmayan kaslarda, karaciğer ve böbrek gibi dokularda da temel ROS kaynağı olduğunu doğrular görünmektedir (Di Meo ve Venditti 2001). Lipidler, proteinler ve DNA üzerine ROS'un neden olduğu oksidatif hasardan da mitokondri kısmen sorumludur. Özellikle mitokondriyal DNA'da meydana gelen değişiklikler solunum komplekslerindeki polipeptidlerde değişikliklere, sonrasında da elektron transferinde azalmaya ve sonuç olarak ROS üretiminde artışa yol açar (Genova ve ark 2004).

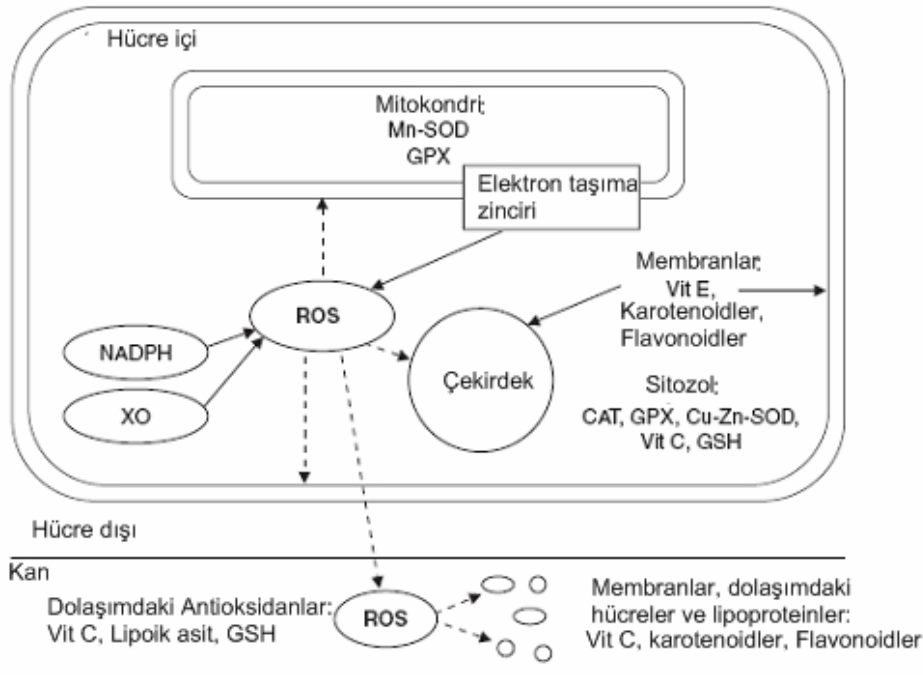
İskemi-Reperfüzyon esnasında ROS oluşumu

İkinci temel ROS kaynağı cerrahi uygulamalar ve şoklardan sonra veya fiziksel egzersiz esnasında oluşan ve iskemi-reperfüzyon olarak adlandırılan olaydır (Şekil 1.1). (Thompson-Gorman ve Zweier 1990, Jackson ve O'Farrell 1993, Frederiks ve Bosch 1995, Fehrenbach ve Northoff 1999). Ksantin dehidrogenaz

(XD) pürinlerin yıkımı ile ürik asit oluşumunda önemli bir role sahiptir. Hipoksik dokularda XD, ksantin oksidaza (XO) dönüştürülür (Frederiks ve Bosch 1995). Reperfüzyon esnasında, XO'nun oksijen, hipoksantin ve ksantin arasında katalizlediği reaksiyon ile O_2^- oluşur (Goldfarb 1999, Heunks ve ark 1999, Cooper ve ark 2002). İskemi-reperfüzyon mitokondriyal serbest radikal üretimini artırır (Di Meo ve Venditti 2001). İskemi-reperfüzyon esnasında serbest radikal üretimindeki artışa fagosit infiltrasyonu, katekolamin, miyoglobin ve methemoglobin otooksidasyonu katkıda bulunur (Gunther ve ark 1999).

Hemoglobin ve miyoglobin oksidasyonu esnasında ROS oluşumu

Hemoglobinin oksidasyonu ROS oluşumuna neden olabilir (Fehrenbach ve Northoff 1999, Thomas 2000). İnsan vücudundaki hemoglobinin % 3'ü otooksidasyon ile dönüşüme uğrar. Bu reaksiyon egzersiz ile artar ve sonuçta methemoglobin ve O_2^- oluşur (Misra ve Fridovich 1972, Wallace ve ark 1982, Brantley ve ark 1993, Cooper ve ark 2002). Miyoglobin, iskemi/reperfüzyon esnasında oluşan H_2O_2 aracılığıyla otooksidasyonla veya serbest radikaller vasıtasıyla okside olabilir, (Wallace ve ark 1982, Brantley ve ark 1993, Gunther ve ark 1999). Miyoglobin daha sonra H_2O_2 ile etkileşime girer ve ferril radikalleri veya peroksil radikalleri oluşur.



Şekil 1.1. İskelet kasındaki potansiyel ROS kaynakları ve temel intrasellüler ve ekstrasellüler antioksidanların yerleşimi (Finaud ve ark 2006).

1.1.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Biyolojik Etkileri

Pozitif etkileri

ROS'lar bağışıklık olaylarından sorumludur, özellikle de fagositoz esnasında antijenlere etki ederler (Jenkins 1988, Rimbach ve ark 1999, Fehrenbach ve Northoff 1999). Bu rolleri inflamasyon esnasında artar. Fiziksel egzersiz, özellikle ekzantrik egzersizler gibi zorlu egzersizler, inflamasyona neden olur (Malm 2001). ROS'lar hücrel sinyallerde veya hücrelerin biyogenezinde önemli bir rol oynarlar, çünkü hücre habercileri olarak etki ederler veya oksidasyon-redüksiyon (redoks) durumunu düzenlerler (Sen ve Parker 1996, Rimbach ve ark 1999, Reid 2001). ROS'lar enzim aktivasyonundan, ilaçların detoksifikasyonundan veya glikojen birikiminin kolaylaştırılmasından sorumludurlar (Jenkins 1988). ROS'lar aynı zamanda kas kasılmasında temel rol oynar. ROS'ların bu rolü önemlidir çünkü ROS oluşumunun inhibisyonu kas liflerinin kasılma güçlerinin kaybolmasına neden olur. Aksine ROS artışı kasılma gücünü artırır (Reid 2001, Andrade ve ark 1998, Coombes ve ark 2001). Ancak kas dokusunda fazla miktarda ROS bulunması kas yorgunluğuna neden olur.

Negatif etkileri

Bazı yararlı etkilerine rağmen, ROS'lar zararlı etkilere de sahiptir çünkü etkileşime girdikleri maddelerin şeklini ve yapısını değiştirebilirler (Alessio 1993, Pietta 2000, Cooper ve ark 2002). Serbest radikaller lipidlerde, proteinlerde ve DNA'da hasara yol açarlar, prokarsenjenlerin aktivasyonunda, hücrel ve antioksidan savunma sistemlerinin zayıflamasında, sülfidrillerin tükenmesinde, kalsiyum dengesinin bozulmasında, gen ekspresyonunda değişikliklerde ve anormal proteinlerin oluşumunda ve birçok hastalığın fizyopatolojisinde rol oynarlar (Bagchi ve ark 2000). Bu bozulmalar katarakt, kanser, Alzheimer hastalığı veya Parkinson hastalığı gibi dejeneratif patolojilere veya hücre yaşlanmasına neden olur (Golden ve ark 2002). ROS'ların ve oksidatif stresin birçok hastalıktan sorumlu olduğu iddia edilmektedir. Bununla birlikte oksidatif stresin hastalıklardaki rolü daima aynı değildir ve 3 gruba ayrılabilir:

1. Oksidatif stres bazı hastalıklara neden olabilir.
2. Oksidatif stres hastalığın nedeni değildir ama hastalığın patolojisinde rol oynayabilir (ateroskleroz ve romatoid artrit gibi).

3. Pek çok hastalıkta oksidatif stres gelişir ancak hastalığın patolojisinde oksidatif stres rol almaz (Halliwell ve ark 1992).

Lipid oksidasyonu

ROS'lar lipoprotein oksidasyonunu, özellikle de LDL oksidasyonunu başlatırlar (Morel ve ark 1983). Bu oksidasyon kan antioksidan kapasitesinden bağımsızdır ve oksidatif stres ile birlikte artabilir (Terentis ve ark 2002). ROS'lar aynı zamanda hücre membranının yapısına katılan çoklu doymamış yağ asitlerini okside etme yeteneğine sahiptirler (Alessio 1993). Bu reaksiyon lipid peroksidasyonunu başlatır. Lipid peroksidasyonu hücre membranının akışkanlığını değiştirir, konsantrasyon gradyanının dengesini bozar ve membran geçirgenliğini ve inflamasyonu artırır (Radak ve ark 1999a).

Protein oksidasyonu

ROS'lar kanda ve yapısal proteinlerde oksidasyona neden olabilir ve proteolitik sistemleri inhibe ederler (Packer 1997). Oksidasyon esnasında proteinler amino asitlerinin tamamını veya bir kısmını kaybedebilirler. Bu reaksiyonlar yapısal proteinlerde veya enzimlerin fonksiyonlarında değişikliklere yol açar (Radak ve ark 1999b). Protein ve amino asit oksidasyonu oksidatif hasarın genel belirteçleri olarak kullanılan protein karbonil gruplarının ve okside amino asitlerin seviyelerinde artışa neden olur (Stadtman ve Levine 2000, Levine 2002).

DNA oksidasyonu

ROS'ların DNA sarmalının parçalanmasına ve baz tamir sisteminde hasara neden oldukları bilinmektedir (Wallace 2002). DNA'nın her parçası ROS saldırısına karşı hassastır (Dizdaroğlu ve ark 2002). DNA'da devamlı bir tamir sistemi mevcuttur ama kapasitesi aşılabılır veya tamir süreci bozulabilir (Beckman ve Ames 1997, Wallace 2002). Sonuç olarak DNA oksidasyonu mutasyonlara neden olabilir, bu da kanserin ve hücre yaşlanmasının en temel faktörüdür (Beckman ve Ames 1997, Kasai 2002, Wallace 2002).

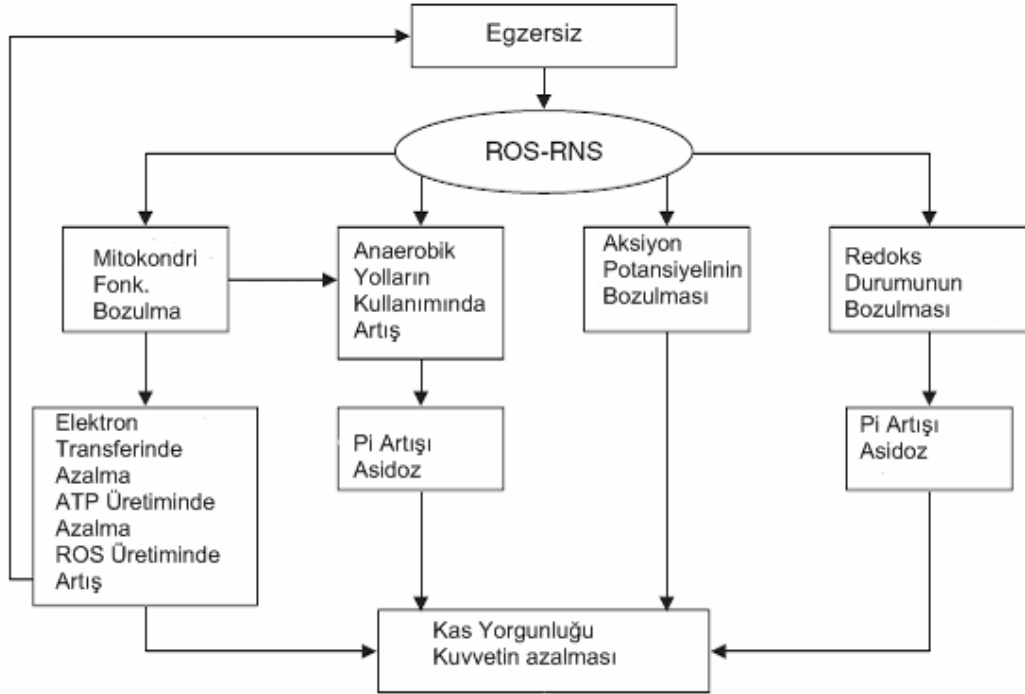
1.1.5. Serbest Radikallerin Kas Yorgunluğundaki Rolü

Kas kasılması için minimal miktarlarda ROS gereklidir (Reid 2001, Coombes ve ark 2001). Bununla birlikte, kaslarda ROS konsantrasyonunun artması sonucunda oluşan oksidatif stres, kasılma esnasında kas yorgunluğuna ve egzersiz sonrasında kas hasarına ve ağrıya neden olur (Reid ve ark 1992, Tiidus 1998, Powers ve Lennon 1999, McArdle ve ark 2001). ROS konsantrasyonu çok arttığında veya çok uzun süre devam ettiğinde, zamana ve doza bağlı olarak kas yorgunluğu gözlenebilir (Reid 2001, Coombes ve ark 2002). Serbest radikallerin aracılık ettiği kas yorgunluğunda pek çok faktör rol alır (Şekil 1.2). ROS'lara maruz kalma sonucunda mitokondriyal fonksiyonlarda meydana gelen değişikliklerin kas yorgunluğunun temel faktörü olduğu düşünülmektedir (Reid ve ark 1992, Coombes ve ark 2002). Gerçekte mitokondri ROS'un lipidlerde, proteinlerde ve DNA'da neden olduğu oksidatif hasara özellikle hassastır ve mitokondrial DNA'daki hasar solunum komplekslerinde değişikliklere ve sonuçta elektron transferinde ve ATP oluşumunda azalmaya neden olur. Böylece aerobik yolların etkinliği azalır. Sonuç olarak bu süreç anaerobik yolların kullanımının artmasına neden olur. Bunun kasta negatif etkileri vardır, çünkü anaerobik metabolizma kas yorgunluğunun iki temel faktörü olan inorganik fosfat (Pi) seviyelerinin ve asidozun artmasına neden olur (Reid ve ark 1992).

Kontraktıl proteinler (aktin ve miyozin) ve kalsiyum pompası redoks durumuna hassastır. Redoks durumu ROS konsantrasyonu tarafından düzenlenir ve onunla direkt olarak ilişkilidir. Sonuçta kas kasılması (kontraktıl proteinler) ve kas kasılmasının kontrolü (kalsiyum pompası) değişebilir (Goldfarb 1999). ROS'lar kas hücreleri içinde intrasellüler kalsiyum artışına ve intrasellüler enzimlerin inaktivasyonuna neden olur, bunlar da kas yorgunluğunun oluşmasına yol açan faktörlerdir. Üstelik ekzantrik egzersiz sırasında önemli bir demir salınımı (ferritin veya hemoglobinden) gözlenebilir. Demir salınımı egzersiz sırasında ve sonrasında oksidatif stresi ve kas yorgunluğunu ve hasarını artırabilir (Childs ve ark 2001).

ROS'lar kas içindeki potasyum taşıma sisteminde de önemli bozukluklara neden olur. Maksimal güç oluşumunda kas yorgunluğunun yol açtığı azalmanın kas nitrik oksit düzeylerindeki artışın sonucu olduğu gösterilmiştir (Sen ve ark 1995). Üstelik NO membranın hiperpolarizasyonuna neden olur (böylece güç oluşumunun

azalmasına yol açar) ve aynı zamanda iskelet kasında güç oluşturan proteinleri direkt olarak inhibe edebilir.



Şekil 1.2. Reaktif oksijen türlerinin kas yorgunluğu üzerine etkileri hakkındaki farklı hipotezler (Finaud ve ark 2006).

1.1.6. Antioksidanlar

Antioksidan; oksidatif stresin şiddetini daha az aktif radikal oluşturarak veya serbest radikal zincir reaksiyonunun proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve DNA üzerine hasarını azaltmak suretiyle bastırmaya yardımcı olan maddedir (Dekkers ve ark 1996).

Bir antioksidanın faydalı olma potansiyeli değerlendirilirken şu özellikleri göz önüne alınır:

1. Emilimi ve vücut tarafından kullanılabilirliği
2. Etkin dozu, güvenliği ve toksisitesi
3. Hürelere, dokulara ve ekstraselüler sıvılara dağılımı
4. Serbest radikalleri kovabilme yeteneği
5. Metal bağlama aktivitesi

6. Gen ekspresyonuna etkisi
7. Hücresel antioksidanlarla ve antioksidan enzimlerle olan ilişkisi
8. Kanserojen metabolitleri detoksifiye etme yeteneği (Bagchi ve ark 2000)

Hücreler, metabolik süreçlerin sonucunda devamlı olarak serbest radikal ve ROS üretirler (Urso ve Clarkson 2003). Serbest radikallerin hücre içerisinde üretimi o kadar fazladır ki, ani yıkımlardan ve ölümden kaçınmak için hücrede bir koruma sisteminin varlığı gereklidir. Çok sayıda koruma/savunma basamağı tanımlanmıştır: Birinci basamak endojen serbest radikal üretiminin azaltılmasıdır; mitokondriden serbest radikal sızıntısının azaltılmasıyla gerçekleştirilir.

İkinci basamak metabolik hızın azaltılmasıdır.

Üçüncü basamak oksidatif stres hasarında anahtar hedeflerin dirençlerinin artırılmasıdır.

Dördüncü basamak antioksidanlar tarafından temizlenmek suretiyle serbest radikallere karşı korumanın artırılmasıdır.

Beşinci basamak tamir, geri dönüşüm ve yeniden şekillendirme sürecidir.

Altıncı basamak ise hücrenin nükleik asit, protein ve lipid unsurları için tamir sürecidir (Cutler ve ark 2005).

Fizyolojik koşullarda, hücreler oluşan serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Bu sistemler şu şekilde sınıflandırılabilir:

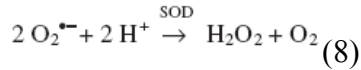
A. Enzimatik Antioksidanlar: Süperoksit Dismutaz (SOD), katalaz (CAT), selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR).

B. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar: C vitamini, E vitamini, A vitamini, flavonoidler, melatonin, ürik asit, albümin, haptoglobulin, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, ferritin, oksipurinol, ubikinon (koenzim Q10), bilirubin, mannitol, lipoik asit ve hemopeksin (Halliwell ve ark 2000). Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir.

Enzimatik antioksidanlar

Süperoksit dismutaz

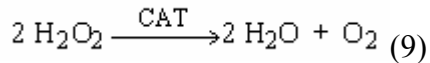
SOD, süperoksit radikallerine karşı temel savunmadır ve oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturur. SOD, $O_2^{\cdot-}$ dismutasyonunu katalizleyerek H_2O_2 oluşumunu sağlayan bir grup enzimdir (Eşitlik 8).



Vücutta SOD'nin farklı formları mevcuttur (Çizelge 1.2 ve Şekil 1.1). Manganez mitokondride bulunan Mn-SOD formunun, bakır ve çinko ise sitozolde bulunan Cu-Zn-SOD'nin kofaktörüdür (Finaud ve ark 2006).

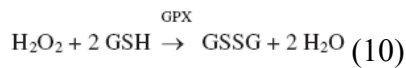
Katalaz

CAT bütün hücrelerde ama özellikle peroksizomlarda bulunur. Peroksizomlar toksik maddeleri detoksifiye etmek için oksijen kullanan ve sonuçta H_2O_2 üreten hücre yapılarıdır (Antunes ve ark 2002). Katalaz H_2O_2 'yi su ve oksijene dönüştürür (Eşitlik 9).



Glutasyon peroksidaz

GPx hücrede sitozol ve mitokondri içerisinde bulunur ve H_2O_2 'yi suya dönüştürür (Eşitlik 10). Bu reaksiyonda GSH kullanılır ve okside glutatyona (GSSG) dönüştürülür.



GPx ve CAT, H_2O_2 üzerinde aynı etkiye sahiptir ama GPx yüksek H_2O_2 konsantrasyonlarında, CAT düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında daha etkilidir (Clarkson 1995).

Çizelge 1.2. Antioksidan enzimlerin lokalizasyonu ve etkileri (Finaud ve ark 2006)

Antioksidan	Kofaktörü	Hücredeki Yerleşimi	Hedefi
Mn-SOD	Mangan	Mitokondri	Süperoksit anyonu Peroksinitrit
Cu-Zn-SOD	Bakır Çinko	Sitozol-mitokondri (Membranı)	Süperoksit anyonu Peroksinitrit
CAT	Demir	Peroksizom, sitozol ve mitokondri	Hidrojen peroksit
GPx	Selenyum	Sitozol ve mitokondri	Hidrojen peroksit, Peroksinitrit

Enzimatik olmayan antioksidanlar

E vitamini (Tokoferol)

E vitamini hücre ve mitokondiyal membranlardaki varlığından ve ROS'lar üzerine direkt etkisinden dolayı en güçlü zincir kırıcı antioksidan olarak bilinmektedir (Evans 2000). E vitamini; C vitamini, GSH, β -karoten veya lipoik asit gibi çok sayıda antioksidanla etkileşim halindedir. Bu antioksidanlar E vitaminini okside formundan tekrar oluşturma kapasitesine sahiptirler (Coombes ve ark 2001). E vitamininin moleküler yapısı lipid ortamda ROS inaktivasyonuna, özellikle de peroksil radikallerine karşı koruma için olanak sağlar (Liebler ve ark 1986, Mastaloudis ve ark 2001).

C vitamini (Askorbik asit)

C vitamini suda çözünen bir vitamindir ve ekstrasellüler sıvılardaki en önemli antioksidandır, sitozolde de etkilidir (Palmer ve ark 2003). Sıvılarda C vitamini ROS'ları nötralize etme yeteneğine sahiptir. Hücre içerisinde C vitamini; E vitamini ve GSH ROS'lar ile reaksiyona girdikten sonra aktif formlarının tekrar oluşması için onların etkisini artırır (Ashton ve ark 1999, Evans 2000). C vitamini güçlü bir oksidan etkiye sahip olan bakır iyonlarını da yakalama yeteneğine sahiptir.

β -Karoten ve A vitamini

A vitamini pek çok lipid özellikte maddede bulunan ve yağda çözünen bir vitamindir. β -karoten hücre membranlarında bulunur ve vücudun ihtiyacına göre A vitaminine dönüştürülür. β -karotenin ROS'ları inaktive ettiği ve lipid peroksidasyonunu azalttığı ileri sürülmüştür (Ozhogina ve Kasaikina 1995, Powers ve Lennon 1999). Bununla birlikte, β -karotenin ve A vitamininin ROS'lara karşı etkinliği E ve C vitaminine kıyasla daha azdır (Ozhogina ve Kasaikina 1995).

Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerdeki fenilalanin, tirozin ve malonat amino asitlerinden meydana gelen fenolik maddelerdir. In vitro çalışmalarda, flavonoidlerin antioksidan etkisini prooksidan enzimlerin inhibisyonu ile veya Fe^{+2} , Fe^{+3} veya Cu^{+2} gibi prooksidan iyonlarla kompleksler oluşturarak gösterdiği iddia edilmiştir. Flavonoidlerin hidrojen atomu vererek bazı ROS'lar üzerine direkt yakalayıcı etkisi vardır (Finaud ve ark 2006).

Thioller

Thioller, aktif bölgelerinde sülfidril kalıntıları bulunan bir grup moleküldür. Thioller sülfür içeren sistein ve metionin amino asitlerinden sentezlenirler. Biyolojik sistemlerde protein sentezi, redoks, hücre biogenezi ve immunité gibi çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Ayrıca antioksidan savunma ağında temel rol oynarlar (Sen ve Packer 2000). GSH, organizmada bulunan temel thioldür. GSH, ROS'ları direkt olarak detoksifiye edebilir ve E ve C vitamininin fonksiyonel antioksidan kapasitesini artırır (May ve ark 1996). Oksidatif streste, GSH/GSSG oranında ve total thiol miktarında azalma gözlenebilir (Tessier ve ark 1995, Sen ve Packer 2000, Svensson ve ark 2002).

Hücrelerdeki düşük GSH konsantrasyonu hücresel hasara ve bağışıklık sisteminin etkinliğinin azalmasına yol açabilir, ancak bu durum E ve C vitamini takviyesi ile kompanse edilebilir (Shang ve ark 2003). Bu sonuçlar, bu antioksidanların aynı hedefler üzerine etki ettiğini ve ROS'lara karşı beraber çalıştığını göstermektedir. Lipoik asit, lipid peroksidasyonunu inhibe eden ve E ve C vitaminlerinin okside formundan indirgenmesine yardım eden bir diğer thioldür (Scott ve ark 1994, Coombes ve ark 2001). Ayrıca, sistein amino asidini okside formu olan sistine indirger, böylece thiol oluşumunu destekler. Bundan dolayı, lipoik asit takviyesi antioksidan korumayı artırır ve tedavi edici etki gösterebilir (Sen ve Packer 2000).

Koenzim Q10

Koenzim Q10 ATP sentezi için gerekli olan endojen bir moleküldür ve özellikle mitokondiyal membranda bulunur (Linnane ve ark 2002). Koenzim Q10'un peroksil radikalleri üzerine direkt veya E ve C vitaminlerinin rejenerasyonu vasıtasıyla dolaylı etkiyle antioksidan görev yaptığı bilinmektedir (Crane 2001).

Ürik asit

Ürik asit plazma ve kaslarda singlet oksijen, HOCL, peroksil radikali, peroksinitrit veya ozon üzerine direkt etki gösteren önemli antioksidanlardan biridir (Wayner ve ark 1987, Kaur ve Halliwell 1990, Hooper ve ark 1998, Hooper ve ark 2000, Kean ve ark 2000). Bazı çalışmalarda (Wayner ve ark 1987) plazmadaki antioksidan kapasitenin büyük kısmını (>% 50) ürik asidin gösterdiği iddia edilmiştir. Böylece, ürik asit eritrositlerin, hücre membranlarının ve DNA'nın serbest

radikal oksidasyonundan korunmasına yardım eder. Ürik asidin diğer bir önemli antioksidan özelliği demir iyonları ile stabil kompleksler oluşturma yeteneğidir. Bu süreç C vitamini oksidasyonunu ve Fe⁺³'ün katalizlediği lipid peroksidasyonunu inhibe eder (Davies ve ark 1986, Sevanian ve ark 1991). Bundan dolayı ürik asit C vitaminini ve E vitaminini koruyucu etki gösterir.

Isı şok proteinleri

Isı şok proteinleri (HSP), çeşitli streslere karşı koruyucu etki gösteren bir seri proteindir. HSP egzersizle, vücut sıcaklığı değişikliklerinde, inflamasyonda ve oksidatif strese artar. HSP'ler antioksidan olarak düşünülmektedir, çünkü hücreleri ve intrasellüler proteinleri serbest radikallerin neden olduğu hasara karşı korurlar. HSP'nin kaslarda egzersizin neden olduğu hasara karşı önemli koruma sağladığı gösterilmiştir (Nishizawa ve ark 1999, Smolka ve ark 2000, Hamilton ve ark 2003).

Ferritin

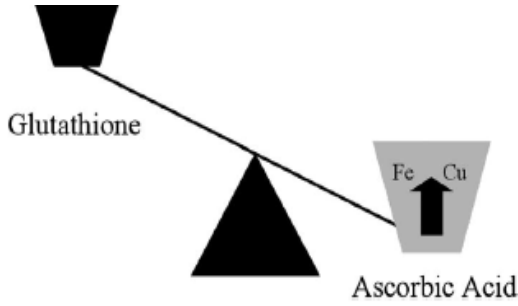
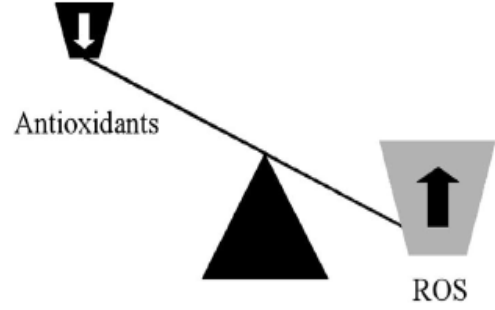
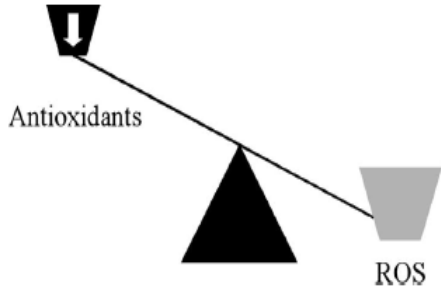
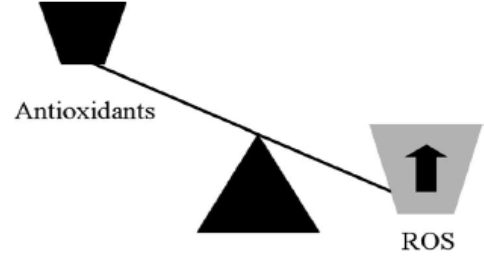
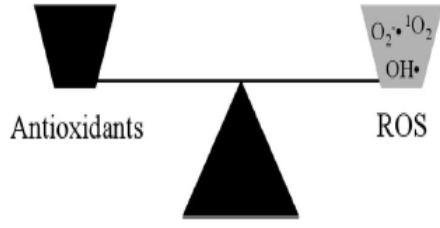
Ferritin vücudun demir dengesinin düzenlenmesinde ve serbest radikallerin neden olduğu hasara karşı koruyucudur, çünkü ferritin kandaki ve hücrelerdeki demiri yakalamak suretiyle serbest radikal oluşumunu en aza indirir (Meneghini 1997, Orino ve ark 2001, Arosio ve Levi 2002).

Albümin, bilirübin ve serüloplazmin

Albümin, bilirübin ve serüloplazmin serbest radikallere elektron vererek non-özgün zincir kırıcı antioksidan olarak etki ederler (Prior ve Cao 1999). Bununla birlikte, bu proteinler sınırlı antioksidan etkiye sahiptir, çünkü etkileri dolaylıdır ve kan gibi vücut sıvılarında etkilidirler.

1.1.7. Oksidatif Stres ve Oksidatif Hasarın Tanımı

Oksidatif stres serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma arasında hücrel hasarla sonuçlanan bir dengesizlik olarak tanımlanır (Jenkins 2000). Oksidatif stres, normal antioksidan kapasite ve fonksiyonda artan ROS üretimi ile, normal ROS üretiminde azalan antioksidan kapasite ile, her ikisinin kombinasyonunda veya farklı antioksidan elemanlardaki bir dengesizlikten dolayı gerçekleşebilir (Şekil 1.3) (Deaton ve Marlin 2003).



Şekil 3e: Diyetle aşırı nonenzimatik antioksidan alımı gibi özel durumlar da, oksidatif strese yol açabilir. Bunun bir örneği aşırı askorbik asit alımıdır. Demir ve bakır gibi metal iyonları, indirgenmiş askorbik asitle ilişkiye girerek ROS üretimine neden olur.

Şekil 1.3. Oksidatif stresin meydana geldiği durumlar.

Oksidatif stresin varlığı her zaman oksidatif hasara işaret etmez. Oksidatif hasar, belirteçlerinin ölçümüyle doğrulanabilir.

1.1.8. Biyolojik Sistemlerde Oksidatif Stresin Değerlendirilmesinde Kullanılan Metotlar

Oksidatif stres; I. Serbest radikallerin, II. Radikallerin lipidler, proteinler ve DNA molekülleri üzerine neden olduğu hasarın, III. Antioksidan enzimlerin aktivitelerinin veya konsantrasyonlarının ölçülmesi ile hesaplanabilir (Duthie 1999, Clarkson ve Thompson 2000, Jenkins 2000).

Serbest radikallerin direkt olarak tayini

ROS üretimi direkt metotlarla belirlenebilir. Elektron spin rezonans tekniği ROS'ların paramanyetik özelliklerinden yararlanarak direkt olarak ölçülmelerine olanak sağlayan bir spektroskopik metottur (Ashton ve ark 1998, Rimbach ve ark 1999, Ashton ve ark 1999). Bu metot ile ölçümler in vivo, in vitro veya ex vivo olarak yapılabilir. Bununla birlikte, bu metotta kullanılan ürünlerin toksisitesinden dolayı insanlarda direkt olarak ölçüm yapmak (in vivo) uygun değildir. ROS'ların kısa yarı ömürleri, güçlü reaksiyona girme yetenekleri ve düşük konsantrasyonlarından dolayı kan örneklerini çalışmak dikkat gerektirmektedir. Bu direkt yöntem ROS reaksiyonlarının ve ROS miktarlarının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamaktadır (Rimbach ve ark 1999).

Lipidler, proteinler ve DNA moleküllerinde oksidatif hasarın ölçümü

Lipid peroksidasyonu

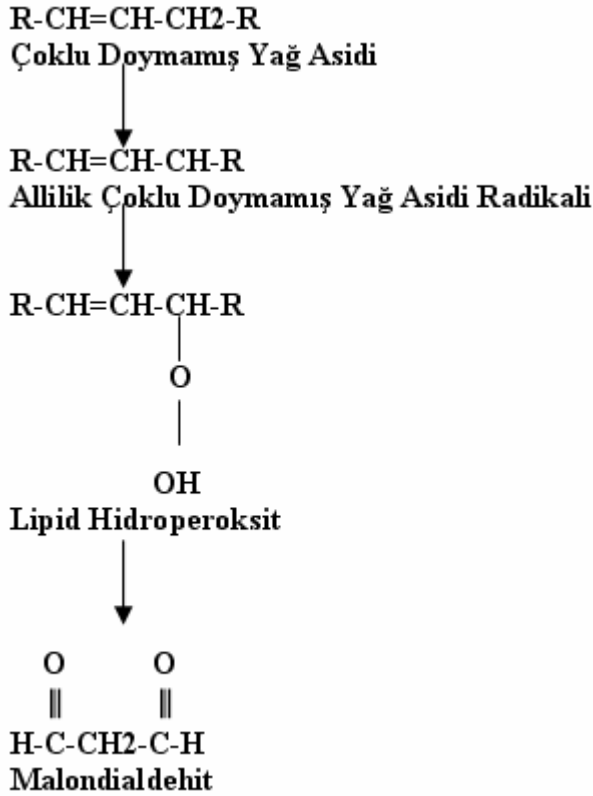
Oksidatif stres çalışmalarında temel yaklaşım membran lipidlerindeki veya yağ asitlerindeki peroksidasyon hızının ölçülmesidir. Lipid peroksidasyonu lipidlerin parçalanması ve sonuçta konjuge dienler veya lipid hidroperoksitler gibi birincil oksidasyon ve malondialdehit (MDA), F2-izoprostan veya ekspire pentan, etan veya hekzan gibi ikincil oksidasyon ürünlerinin oluşmasıdır (Finaud ve ark 2006).

Konjuge dienler lipid peroksidasyonunun başlangıç fazında çoklu doymamış yağ asitlerinin moleküler organizasyonunu analiz eder. Özgünlüğünden dolayı bu metot oksidatif stres çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Aruoma 1999, Clarkson ve Thompson 2000). Konjuge dienler spektrofotometre veya HPLC ile ölçülür. Egzersizin plazmada konjuge dienleri artırdığı gösterilmiştir (Urso ve Clarkson 2003).

Lipid hidroperoksitler (LOOH) MDA oluşumuna sebep olan yolda daha erken oluşurlar (Şekil 1.4) ve hücrel membran hasarının özgün belirteçleridir, kan ve dokudaki LOOH'ı analiz etmek için HPLC ve enzimatik metotlar kullanılır (Rimbach ve ark 1999). Egzersizden sonra kan LOOH seviyesinde artış bildirilmesine rağmen, çoğu çalışma LOOH'ı egzersizde oksidatif stres belirteci olarak kullanmamıştır (Urso ve Clarkson 2003).

Diğer ürünler oksidatif stresi ölçmek için sıklıkla kullanılır ama ikincil oksidasyon ürünleri oldukları için bazı dezavantajları vardır. Bunlardan birisi MDA'dır ve yağ asitlerinin otooksidasyonu esnasında üretilir. Bu madde genellikle thiobarbitürik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan thiobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) vasıtasıyla ölçülür. TBARS analizi MDA'ya özgün olmamasına rağmen bu metot lipid peroksidasyonunun genel belirteci olarak kullanılmaktadır, ama sonuçlar dikkat gerektirir (Rimbach ve ark 1999, Clarkson ve Thompson 2000). Aldehitler, özellikle de MDA, oksidatif stres belirteci olarak egzersizde sık kullanılır. MDA HPLC ile spektrofotometriyle veya spektrofloresan olarak ölçülebilir (Urso ve Clarkson 2003). Bu metodun in vivo çalışmalarda oksidatif stres belirteci olarak kullanılması eleştirilmektedir; çünkü TBARS özgün değildir. Bu sırada doymuş ve doymamış non-fonksiyonel aldehitler, karbonhidratlar ve prostaglandinler de ölçülür (Vollaard ve ark 2005).

Lipid peroksidasyonunun ölçümü için kullanılan ileri bir teknik, ekspirasyon havasındaki pentan, ethan ve hekzan gibi uçucu hidrokarbon son ürünlerinin analizidir. Bu metot non-invaziftir ama tam olarak doğru değildir, çünkü bu gazlar vücutta serbest radikal oksidasyonundan başka yollarla da oluşabilir (Rimbach ve ark 1999). Ekspirasyon havasındaki pentan gaz kromatografik tekniklerle de ölçülebilir. Dillard ve ark (1978) egzersizle ekspirasyon havasındaki pentanın arttığını, ama inpire edilen ozonun artmadığını bulmuşlardır. Aerobik egzersiz sırasında ve hemen sonrasında egzersiz şiddeti ile orantılı olarak ekspirasyon havasındaki pentan seviyeleri artar. Bu metodun hassas olduğu düşünülmektedir. Zor bir metottur (Urso ve Clarkson 2003).



Şekil 1.4. Lipid peroksidasyonunun basamakları (Urso ve ark 2003).

Oksidatif stresi analiz etmek için kullanılan diğer bir belirteç, prostaglandin benzeri bir bileşik olan F2-izoprostanlardır. F2-izoprostanlar araşidonik asidin siklooksijenazdan bağımsız peroksidasyonu ile üretilir ve gaz kromatografisi kütle spektroskopisi (GC-MS) kullanılarak ölçülür. İnsan plazmasındaki F2 izoprostan konsantrasyonu 5-40 pg/ml arasında değişir (Watson ve ark 2005). F2-izoprostan bileşiğinin endojen lipid peroksidasyonunu ve oksidan hasarı ölçmek için uygun bir belirteç olduğu gösterilmiştir (Willcox ve ark 2002).

Protein modifikasyonu

Proteinlerde serbest radikallerin neden olduğu modifikasyonlar amino asit yan zincirlerinde karbonil gruplarının oluşmasına neden olur. Oksidatif stresle ilgili tüm olaylarda karbonil artışı söz konusudur. Bundan dolayı, karbonil oluşumunun ölçülmesi proteinlerdeki serbest radikal hasarının belirlenmesinde en sık kullanılan metottur (Stadtman ve Levine 2000, Levine 2002). Protein oksidasyonunun daha doğru bir endeksi olan karbonil/protein oranını belirlemek için genellikle total protein de ölçülür. Karbonillerin yarılanma ömrü uzun olduğundan bu metot ilgi

çekmektedir (Chen ve ark 2001). Okside protein ölçümü için kullanılan alternatif bir metot okside amino asit (o-óditirozin gibi) tayinidir (Leeuwenburgh ve ark 1999).

DNA modifikasyonu

ROS'lar DNA sarmalının parçalanması, DNA-protein çapraz bağlarında ve bazlarında modifikasyonlar gibi birçok tip DNA hasarına neden olur (Dizdaroğlu ve ark 2002). Bugünlerde DNA modifikasyonunun belirlenmesi için çok sayıda metot kullanılmaktadır. En sık kullanılan belirteç serbest radikallerin neden olduğu guanin oksidasyonu vasıtasıyla üretilen 8-hidroksi-2-deoksiguanozin dir (8-OHdG). Okside olan DNA sürekli olarak tamir edilir ve 8-OHdG gibi okside nükleotidler idrar veya kan yolu ile uzaklaştırılırlar. Bu sebeple invazif ve non-invazif yöntemler mevcuttur (Rimbach ve ark 1999).

Diğer dolaylı oksidatif stres belirteçleri

Kreatin kinaz (CK) ve miyoglobin kas hücresi hasarının belirteçleridir (Orteblad ve ark 1997, Petibois ve ark 2002). Bu parametreler oksidatif stresin dolaylı belirteçleri olarak da kullanılır, çünkü lipid peroksidasyonu hücre membranlarında hasara yol açar (Rimbach ve ark 1999, Petibois ve ark 2002). Böylece, hücre membranları bu intrasellüler maddelere karşı geçirgen hale gelir. Bununla birlikte CK ve miyoglobin sporcularda oksidatif stresin özgün belirteci değildir. Çünkü sporcularda sporun karakteristiğine bağlı olarak bazal plazma CK ve miyoglobin düzeyleri yüksektir (Dawson ve ark 2002).

Antioksidan ölçümleri

Enzimatik antioksidan aktivitesi

Enzimatik antioksidan aktivitesi (SOD, CAT ve GPx) istirahattaki antioksidan durumunu değerlendirmede kullanılabilir, özellikle fiziksel aktiviteden sonraki oksidatif stresin derecesini gösterebilir (Finaud ve ark 2006).

Antioksidan vitaminler

Antioksidan vitaminlerin (A, E ve C vitaminleri) plazmadaki miktarlarının değerlendirilmesi, antioksidan korumanın ve vitamin eksikliğinin tayininde en sık kullanılan yöntemdir. Antioksidan vitamin konsantrasyonları da oksidatif stresin varlığından etkilenir ve oksidatif stresin dolaylı belirteci olarak kullanılabilir (Rimbach ve ark 1999).

Diğer antioksidanlar

Vücudun antioksidan kapasitesinin ve oksidatif stresin ölçülmesi için kullanılan ileri bir teknik tiol proteinlerinin ölçümüdür. Diğer antioksidanlar gibi tiol proteinlerinin kaybı uzun süreli oksidatif stres esnasında ortaya çıkar. Bununla birlikte, insan vücudundaki en önemli tiol olan GSH'nın ve GSSG'nin (GSH'nın okside formu) tayini oksidatif stresin değerlendirilmesinde kullanılan en önemli tekniktir. GSH/GSSG oranı oksidatif stresin ilginç bir belirteçidir, çünkü serbest radikaller GSH'ı GSSG'ye okside eder (Tessier ve ark 1995, Svensson ve ark 2002).

Ürik asit plazma ve kasta bulunan önemli bir antioksidandır. Bununla birlikte ürik asit konsantrasyonu, oksidatif stres, pürin siklusu ve renal atılım ile değişiklik gösterebilir. Bu nedenlerden dolayı ürik asit tek başına antioksidan kapasitenin ve oksidatif stresin uygun bir belirteci olarak kullanılamaz; bununla birlikte, ürik asidin oksidasyon ürünü olan allantoin oksidatif stresin uygun bir endojen belirteci olabilir. Allantoin normal şartlar altında insanların vücut sıvılarında bulunmaz. Allantoinin oksidatif stres belirteci olarak geçerliliğinin sınırlı olduğu ileri sürülmüştür, çünkü kan örneklerindeki allantoin serbest radikaller tarafından parçalanabilir veya okside edilebilir (Marklund ve ark 2000).

Total antioksidan kapasite

İnsanlarda vücut sıvılarında veya dokularda çok sayıda antioksidan bulunduğu için her bir antioksidanı ayrı ayrı ölçmek zordur. Bundan dolayı, biyolojik örneklerin total antioksidan kapasitesini (TAC) ölçmek için çok sayıda metot geliştirilmiştir (Prior ve Cao 1999). TAC genellikle tüm antioksidanların toplam değerini verir. Bununla birlikte, antioksidan kapasitedeki değişiklikleri yorumlamak zordur, çünkü beslenme durumunun veya oksidatif strese adaptasyonun bir sonucu olarak artabilir. Üstelik bazı antioksidanların konsantrasyonları TAC'de herhangi bir değişiklik olmaksızın değişebilir (Kohen ve ark 2000).

Sonuç olarak; oksidatif stresi veya antioksidan durumunu ölçmek için tek bir ölçüm yeterli değildir. Verilerin tek bir belirtece göre yorumlanması hatalara neden olur. Bundan dolayı, TAC'nin, lipidler, proteinler ve DNA üzerine serbest radikallerin neden olduğu hasarın belirteçlerinin ve izole antioksidanların birarada ölçümü uygun yöntem olabilir (Prior ve Cao 1999).

1.2. Egzersizde Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma

Egzersiz esnasında oksijen tüketiminin artması serbest radikal üretiminde artışa yol açar. Oluşan serbest radikaller enzimatik ve nonenzimatik antioksidanları içeren bir savunma sistemi tarafından nötralize edilir. Egzersiz, ROS ve antioksidanlar arasında oksidatif stres olarak adlandırılan bir dengesizlik oluşturur (Urso ve Clarkson 2003). Düzenli antrenmanın sağlık açısından çok sayıda faydası varken, şiddetli fiziksel stresörler muhtemelen ROS üretimindeki artıştan dolayı oksidatif hasarı artırabilir (Vollard ve ark 2005).

Egzersiz, birçok farklı sistemin aktivasyonu ile radikal oluşumunda neden olabilir. Birincil kaynaklar aerobik solunum esnasında mitokondriden elektron sızıntısı, prostanoid metabolizması, katekolaminler, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz enzimleridir. İkincil kaynaklar ise fagositik hücreler, demir içeren proteinlerin parçalanması ve aşırı kalsiyum birikmesidir (Bloomer ve ark 2005).

Fiziksel aktivite serbest radikal üretimini birçok yolla artırır (Deaton ve Marlin 2003):

1. Egzersizde oksijen tüketimi artar. Mitokondriyal elektron transfer zincirinden elektron sızıntısı süperoksit anyonu üretiminde artışla sonuçlanır.
2. Ksantin dehidrogenaz, hipoksantini ksantine ve ksantini de ürik aside okside eder. Şiddetli egzersizde aktif kaslarda hipoksi gelişince anaerobik metabolizmayla ksantin üretilir ve XD, XO'ya dönüştürülür. Reperfüzyonda ise, oksijen artışı sonucunda ksantin oksidaz hipoksantini ürik aside dönüştürür ve süperoksit oluşumunda elektron alıcısı olarak oksijen kullanılır.
3. Egzersiz sonucunda oluşan doku hasarı daha sonra NADPH oksidaz tarafından serbest radikal üretimi ile nötrofil gibi inflamatuvar hücrelerin aktivasyonuna neden olabilir.
4. Egzersiz esnasında katekolamin konsantrasyonu artar ve bu da ROS'un otooksidasyonu ile sonuçlanır.
5. Egzersizin neden olduğu hipertermi oksidatif hasara neden olabilir.
6. Oksihemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu egzersiz ile artabilir, bu da süperoksit üretimiyle sonuçlanır (Deaton ve Marlin 2003).

1.2.1. Akut Egzersizde Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma

Akut egzersizin, özellikle yüksek şiddette yapıldığında, oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir. Akut aerobik egzersizde oksidatif stresle bağlantılı iki mekanizma vardır:

- a. VO_2 istirahat seviyelerinin 10-15 katına çıktığı zaman kütle olayı etkisiyle pro-oksidan aktivite artar.
- b. Pro-oksidanlara kıyasla antioksidan aktivite yetersiz kalır (Alessio ve ark 2000).

Akut egzersizde oksidatif stres

Akut egzersizin oluşturduğu oksidatif stres özellikle son 10 yılda geniş bir şekilde araştırılmıştır. Bu çalışmalarda akut egzersizden sonra kandaki oksidatif stres belirteçlerinde artış tanımlanması, oksidatif stresin sadece hücresel elemanlarla sınırlı olmadığına işaret etmektedir (Quindry ve ark 2003).

Aerobik egzersizde oksidatif stres

Egzersizin serbest radikal üretimini artırdığı ilk kez 1982 yılında Davies ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. O zamandan bu yana egzersizin oksidatif stres üzerine etkisi birçok çalışmada araştırılmış ve bu çalışmaların çoğunda aerobik egzersizler (koşu, bisiklet ve yüzme gibi) kullanılmıştır (Finaud ve ark 2006). Aerobik egzersizlerde oksijen alımı artar, bu da serbest radikal üretimini artırır. Bundan dolayı pek çok çalışmada (Alessio 1993, Vasankari ve ark 1997, Child ve ark 1998, Liu ve ark 1999, Mastaloudis ve ark 2001, Vider ve ark 2001, Palmer ve ark 2003, Aguilo ve ark 2005) bu tip fiziksel aktivitenin insanlarda ve hayvanlarda serbest radikal üretimini artırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu durum düşük şiddetteki ($< \% 50 VO_{2max}$) egzersizlerde gerçekleşmez. Çünkü bu gibi durumlarda antioksidan kapasite aşılmaz ve serbest radikallerin neden olduğu hasar ortaya çıkmaz (Lovlin ve ark 1987).

Fiziksel egzersiz esnasında oksidatif hasar artışı sadece serbest radikal oluşumu ile değil, antioksidan savunma kapasitesi ile de belirlenir. Bununla birlikte antioksidanlarla egzersiz arasındaki ilişki hakkındaki bilgiler halen yetersizdir, bu da oksidatif hasara karşı korumanın ve antioksidan takviyesi ve/veya eksikliğinin değerlendirilmesinde önemlidir (Ji ve ark 1990).

Serbest radikaller ve GSSG ve lipid peroksidasyonu ürünleri gibi oksidasyon ürünleri tüketici egzersiz esnasında kaslarda artar (Davies ve ark 1982, Lew ve ark 1985, Bejma ve Li 1999, Vina ve ark 2000, Urso ve Clarkson 2003). Artan oksidasyon ürünleri kas hasarına neden olur, bunun sonucunda kas içerisinde bulunan laktat dehidrogenaz, kreatin kinaz ve aspartat-alanin transaminaz gibi enzimler ve miyoglobin, troponin ve HSP70 gibi proteinler plazmaya çıkar (Stokke 1982, Vina ve ark 2000, Gonzalez ve Manzo 2004, Villa-Caballero ve ark 2007). Birçok araştırmacı (Jackson ve ark 1985, Reid ve ark 1994, O'Neil ve ark 1996) kas kasılmasının ROS üretimini artırdığını elektriksel olarak uyarılan kas modelinde in vitro olarak göstermiştir. Ashton ve ark (1999) ve Alessio ve ark (2000) maksimal egzersizden hemen sonra MDA seviyelerinde değişiklik olmaksızın lipid hidroperoksitlerin (sırasıyla % 42 ve % 20) yükseldiğini bulmuşlardır. Bir çalışmada (Kyparos ve ark 2007) insanlarda kısa süreli tüketici aerobik egzersizin plazma TBARS ve protein karbonil düzeylerini artırdığı bildirilmiştir. Mastaloudis ve ark (2001) sporcularda F2 izoprostan seviyelerinin 50 km'lik bir ultramaratondan sonra % 43 arttığını ve 24 saatte bazal seviyelere döndüğünü bildirmişlerdir.

Şiddetli aerobik egzersiz kas hasarına ve takiben inflamasyona cevap olarak nötrofil aktivasyonuna ve nötrofiliye sebep olabilir (Umegaki ve ark 2000). Aktive olan nötrofiller, kendilerine ve komşu hücrelere hasar veren süperoksit ve hidrojen peroksit gibi ROS'lar üretir. Oh-ishi ve ark (1997) şiddetli egzersizden sonra antrenmansız sıçanların nötrofillerinde süperoksit üretiminin arttığını rapor etmişlerdir. Bu bulgular, şiddetli egzersizin kan hücrelerinde ve kaslarda oksijen alımındaki artış yoluyla değil de, kas hasarı dolayısıyla oksidatif DNA hasarına sebep olabileceğini göstermektedir. Nötrofil sayısının ve nötrofillerden oluşan süperoksit seviyelerinin maksimal treadmill egzersizinden hemen sonra en yüksek olması, egzersizin yol açtığı nötrofilinin oksidatif strese katkıda bulunduğunu göstermektedir (Quindry ve ark 2003).

Alessio ve ark (1988) sıçanlarda 1 dakikalık hızlı koşunun (45 m/dk) yavaş ve hızlı kas liflerinde TBARS seviyelerini sırasıyla % 167 ve % 157, lipid hidroperoksitleri ise sırasıyla % 34 ve % 31 artırdığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlara ilave olarak sıçanlarda tükeninceye kadar yaptırılan yüksek şiddetteki egzersizden

sonra plazma XO seviyelerinin 10 kattan fazla arttığı gösterilmiştir (Radak ve ark 1995).

Liu ve ark (2000) akut egzersizin sıçanlarda karaciğer MDA içeriğinde ve glutamin sentetaz aktivitesinde artışa yol açarken herhangi bir organın protein karbonil seviyelerinin değişmediğini göstermişlerdir. Böbrekte MDA ve protein karbonil düzeyleri veya glutamin sentetaz aktivitesi herhangi bir egzersiz tipiyle değişmemiştir. Organlar arasındaki farklılık oksijen tüketimi, oksidanlara ve antioksidan enzim aktivasyonuna duyarlılık, antioksidan seviyeleri ve diğer tamir mekanizmaları gibi birçok faktöre bağlı olabilir. Kas ve kalp oksidatif strese karaciğer ve beyin gibi organlardan farklı cevap verir görünmektedir; bu muhtemelen mitokondriyal biyoyararlanımdaki farklılıktan dolayıdır (Liu ve ark 2000).

Anaerobik egzersizde oksidatif stres

Anaerobik egzersiz, sprint, sıçrama ve direnç egzersizlerini içeren pek çok fizik aktivitede rol alır. Anaerobik egzersizler sonucunda serbest radikal üretimi hakkındaki bilgiler aerobik egzersizlere kıyasla daha azdır (Groussard ve ark 2003a). Bu çalışmalar (McBride ve ark 1998, Radak ve ark 1998, Frank ve ark 2000, Chen ve ark 2001, Kayatekin ve ark 2002, Groussard ve ark 2003a, Ramel ve ark 2004, Goldfarb ve ark 2005) genellikle kısa aralıklarla koşu, sprint, sıçrama, direnç egzersizleri (eksantrik veya konsantrik) veya Wingate testinden sonra oksidatif stresin arttığını göstermiştir.

Anaerobik egzersize özgün serbest radikal üretimindeki artışa aerobik egzersiz sırasında olduğu gibi elektron sızıntısına ilaveten birçok yol aracılık eder (Sahlin ve ark 1992, McBride ve ark 1998, Groussard ve ark 2003a). Ksantin oksidaz üretimi, iskemi/reperfüzyon ve fagositik solunum aktivitesi anaerobik egzersiz esnasında serbest radikal üretim kaynaklarıdır (Sahlin ve ark 1992). Üstelik laktik asit, asidoz, katekolaminler ve egzersiz sonrası inflamasyondaki artış supramaksimal egzersizlerde serbest radikal üretiminin artmasına neden olan diğer faktörlerdir (Sahlin ve ark 1992, Kayatekin ve ark 2002).

Anaerobik egzersiz esnasındaki ve sonrasındaki oksidatif stresten aktif kasların iskemi-reperfüzyonu sorumlu olabilir (Sahlin ve ark 1992). Bu tip

egzersizlerin pürin katabolizmasını önemli ölçüde artırdığı ve hızlı bir deoksijenasyon sağladıkları bilinmektedir. Bu iki olay serbest radikal oluşumunu hızlandıran XO aktivitesini artırır (Goldfarb 1999, Heunks ve ark 1999). İskemi reperfüzyonu esnasında XO'nun serbest radikal oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir, ama XO'nun egzersiz esnasında kaslarda bir radikal üretici olarak etkisini gösteren çalışmalar sınırlıdır. İskemik dokularda XD'nin elektron alıcısı olarak O₂ kullandığı ve proteolitik dönüşüm ile okside forma dönüştüğü ileri sürülmüştür (Goldfarb 1999, Heunks ve ark 1999). XO, hipoksantin ve ksantin substratlarının varlığında moleküler oksijeni O₂⁻ ve H₂O₂'ye indirger. Böylece, XO ve onun etkilediği substratların reperfüze dokularda yüksek konsantrasyonda bulunduğu ve sonuçta reperfüzyon ile oksijen kaynaklı serbest radikallerinin üretiminin arttığı iddia edilmiştir.

Anaerobik egzersiz esnasında serbest radikal üretiminin diğer bir kaynağı da inflamasyon ve hücrel hasardır ve bu, genellikle travmatize egzersizlerde olur (Sahlin ve ark 1992, Saxton ve ark 1994, Ortenblad ve ark 1997, McBride ve ark 1998, Childs ve ark 2001). Hemoglobin veya ferritinden demirin serbest bırakılması inflamatuvar cevapları ve oksidatif stresi artırabilir (Childs ve ark 2001). Laktik asit artışı ile oksidatif stres belirteçlerindeki artış arasında pozitif ilişki olduğu da ispatlanmıştır (Clarkson 1995, Kayatekin ve ark 2002).

Sıçanlarda kısa süreli ve yoğun anaerobik egzersizin lipid ve protein oksidasyonuna neden olduğu bulunmuştur (Radak ve ark 1998). Kısa süreli supramaksimal anaerobik egzersizin (Wingate testi) oksidatif strese neden olduğu ve plazma TBARS seviyelerinin bu tip egzersizler için uygun bir belirteç olmadığı iddia edilmiştir (Groussard ve ark 2003a). Kısa süreli supramaksimal anaerobik egzersiz pürinlerin ksantin ve ürata katabolizmasını uyarır, plazmada urat birikmesi buna delil olarak gösterilmiştir (Groussard ve ark 2003a). Bu çalışmanın aksine, aralarında 2 dakikalık dinlenme dönemleri bulunan 30 saniye süreli 6 zorlu sıçrama egzersizi ile lipid peroksidasyon biyobelirteçlerinin önemli ölçüde artmadığı, birçok antioksidan enzimin (SOD, GPx ve GR) ise önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Ortenblad ve ark 1997).

Aerobik-anaerobik karışık egzersizlerde oksidatif stres

Aerobik-anaerobik karışık aktiviteler hem aerobik hem de anaerobik metabolizmaların dengeli bir şekilde kullanıldığı aktiviteler olarak tanımlanır. Futbol, rugby ve basketbol gibi takım sporları bu tip egzersizlere örnektir. Bu tip egzersizlerin serbest radikal üretimi üzerine etkisi aerobik ve anaerobik egzersizlere benzer görünmekle birlikte, aksini iddia eden çalışmalar da vardır (Finaud ve ark 2006).

Otuz dakikalık aerobik ve anaerobik egzersizin kandaki DNA ve lipid peroksidasyonu üzerine etkisi az iken protein ve glutatyon oksidasyonunu artırdığı, protein oksidasyonunun anaerobik egzersizden, glutatyon oksidasyonunun ise aerobik egzersizden daha fazla etkilendiği bildirilmiştir (Bloomer ve ark 2005). Bunun aksine, aerobik-anaerobik ağırlıklı egzersizin aerobik ağırlıklı egzersize kıyasla daha fazla oksidatif strese sebep olduğu ve kadınların oksidatif strese karşı erkeklerden daha toleranslı oldukları iddia edilmiştir (İlhan ve ark 2004). Cinsiyete bağlı bu farkın açıklaması, erkeklerdeki daha yüksek metabolik hızın mitokondriyal akışta artışa yol açarak ROS üretimini artırması, ayrıca kadınlarda antioksidan özellikler gösteren östrojen hormonunun daha fazla bulunmasıdır (Ide ve ark 2002).

Alessio ve ark (2000) protein karbonillerin yorucu aerobik egzersizden hemen ve 1 saat sonra % 67, anaerobik izometrik egzersizden hemen sonra % 12 arttığını ve izometrik egzersizden 1 saat sonra bazal seviyelere döndüğünü bulmuşlardır. TBARS herhangi bir uygulamaya cevap olarak artmazken lipid hidroperoksitler izometrik egzersiz esnasında % 36, aerobik egzersiz esnasında % 24, oksijen radikallerinin absorban kapasitesi (ORAC) aerobik egzersizde % 25, izometrik egzersizde % 9 artmıştır.

Akut egzersizde antioksidan savunma: Antioksidan kısıtlamasının ve takviyesinin etkileri

Antioksidan durumu egzersiz tipine ve organa bağlı olarak büyüklük ve yön açısından farklılıklar gösterir. Farklı egzersiz tiplerinin farklı seviyelerde oksidatif hasarla sonuçlandığı bilinmektedir (Liu ve ark 2000).

Aerobik egzersizde antioksidan savunma

Dayanıklılık egzersizleri non-enzimatik antioksidan konsantrasyonlarında veya enzimatik antioksidan aktivitelerinde bazı değişikliklere neden olur. İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çok sayıda çalışmada (Ji ve Fu 1992, Clarkson 1995, Leewenburgh ve ark 1999, İnal ve ark 2001) aerobik egzersizden sonra kan veya dokulardaki antioksidan enzim aktivitelerinin (SOD, CAT, GPx) arttığı gösterilmiştir. Bu artış serbest radikal üretiminden sonra çok hızlı gerçekleşir (yaklaşık 5 dakika) ve egzersiz sırasında esas serbest radikal üretim kaynağı olan oksidatif kas liflerine özgündür (Ji ve Fu 1992, Ji 1995, Powers ve Lennon 1999). Bununla birlikte antioksidan enzim aktivitesindeki artış egzersiz şiddeti ile orantılı değildir (Criswell ve ark 1993). Akut egzersiz karaciğer, böbrek ve kalp gibi organlarda da antioksidan profilini etkiler (Boveris ve Navarro 2008).

Tauler ve ark (2004) dolaşımdaki lenfosit sayısı artarken lenfositlerdeki CAT ve GPx aktivitelerinin maksimal testten sonra azaldığını, submaksimal testten sonra ise değişmediğini, maksimal ve submaksimal testlerin nötrofillerdeki GPx, GR aktivitelerini azalttığını, herhangi bir testten sonra CAT veya SOD aktivitelerinde değişiklik olmadığını ortaya koymuşlardır. Bir diğer çalışmada (Kyparos ve ark 2007) ise insanlarda kısa süreli tüketici aerobik egzersizin kan CAT, total antioksidan kapasite ve GSSG düzeylerini artırırken GSH düzeylerini azalttığı bildirilmiştir.

Dağ tırmanışına katılan profesyonel bisikletçilerin nötrofillerinde CAT ve GPx aktivitelerinin azaldığı (sırasıyla % 40 ve % 50), lenfositlerinde GPx aktivitesinin arttığı (% 87), plazma MDA seviyelerinin nötrofil miyeloperoksidaz aktivitesi ve eritrosit malondialdehit seviyeleri ile doğru orantılı olduğu gösterilmiş, yoğun egzersizin eritrosit ve lenfositlerde oksidatif hasara sebep olurken nötrofillerde olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Sureda ve ark 2005). Profesyonel erkek bisikletçilerde bazal iNOS seviyeleri ve SOD aktivitesi nötrofil ve lenfositlerde benzer iken egzersizden sonra iNOS seviyelerinin ve SOD aktivitesinin nötrofillerde azaldığı, lenfositlerde arttığı, arjinaz aktivitesinin sadece nötrofillerde yükseldiği, nitritin SOD aktivitesi ve iNOS seviyeleri ile nötrofillerde korele olduğu, lenfositlerde korele olmadığı bulunmuştur (Sureda ve ark 2006). Aguilo ve ark (2005) antrenmanlı bisikletçilerde 171 km'lik bir egzersizden sonra CAT ve GR

aktivitelerinin ve kan okside glutasyon ve serum ürik asit seviyelerinin arttığını, GPx aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını gözlemişlerdir. Bir saatlik yüzme egzersizinin CAT aktivitesini erkek sıçanlarda karaciğerde % 462, kalpte % 302, böbrekte % 598 ve akciğerde % 253, dişi sıçanlarda ise karaciğerde % 436, kalpte % 251, böbrekte % 760 ve akciğerde % 271 artırdığı gösterilmiştir (Terblanche 2000).

Aerobik egzersizlerin etkisi sadece antioksidan enzimler ile sınırlı değildir. Non-enzimatik antioksidan konsantrasyonları da (plazma, idrar veya dokulardaki) değişir, ama sonuçlar genellikle çelişkilidir. Bazı çalışmalarda (Tessier ve ark 1995, Liu ve ark 1999, Powers ve Lennon 2000, İnal ve ark 2001) egzersizde serbest radikallere karşı kullanıldıklarından GSH veya GSH/GSSG oranının azaldığı ileri sürülmüştür. Bu sonuçların aksine, E ve C vitamini ve ürik asit dayanıklılık egzersizlerinden sonra artma eğilimi göstermektedir (Liu ve ark 1999, Ashton ve ark 1999, Mastaloudis ve ark 2001). Akut egzersizin dokulardaki E vitamini içeriğini önemli ölçüde etkilemesi dokulardaki fizyolojik E vitamini seviyelerinin egzersizin neden olduğu ROS üretimine karşı koymada yeterli olduğunu düşündürmektedir (Gohil ve ark 1987, Tiidus ve ark 1993). Ürik asit artışı oksidatif strese karşı özgün bir adaptasyon olarak düşünülmemektedir, çünkü ürik asit pürin siklusunun son ürünüdür (Takanami ve ark 2000, Mastaloudis ve ark 2001). Sıçanlarda tüketici yokuş aşağı koşusu ile plazma E vitamini seviyesinin egzersizden sonraki 48 saat boyunca değişmediği, plazma askorbik asit seviyesinin önce artıp sonra azaldığı ve plazma askorbik asit konsantrasyonundaki değişikliğin adrenal bezden askorbik asit salınımına bağlı olduğu gösterilmiştir (Umegaki ve ark 2000). Alessio ve ark (2005) ad libitum beslenen sıçanlarda tüketici egzersizin GSH/GSSG oranını azalttığını göstermişlerdir. Quindry ve ark (2003) maksimal egzersizden hemen sonra hem askorbik asit hem de ürik asit seviyelerinin önemli ölçüde düştüğünü bulmuşlardır. Camus ve ark (1994) VO_{2max} 'in % 60'ında 35 dakika yokuş aşağı koşu egzersizden hemen sonra askorbik asitte azalma (~ % 40) gözlemişlerdir. Akut egzersiz sıçanlarda beyinde koenzim Q10, karaciğerde sistein ve sistin ve yavaş kas liflerinde askorbik asit seviyelerinde azalmaya, kalpte GSH ve askorbik asit seviyelerinde artışa neden olur (Liu ve ark 2000). Somani ve ark (1995a) akut egzersizin sıçan kalbinde antioksidan enzim aktivitesinde kronik egzersizin yaptığından daha büyük bir artışa yol açtığını göstermişlerdir. Bu farklılığın tüketici egzersiz esnasında artan

süperoksit ve oksiradikal üretimi ile başa çıkmak için devreye giren kompensatuar mekanizmanın sonucu olduğu ileri sürülmüştür.

Yağda çözünen antioksidanların plazma seviyelerinin egzersizden sonra arttığı; bunun sebebinin de egzersizden sonra HDL ve LDL'nin artması olduğu iddia edilmiştir (Ramel ve ark 2004). Egzersiz esnasında karbonhidrat alımı stres hormonlarının seviyelerinin azalmasına neden olur, bu da oksidatif stresi ve plazma antioksidan potansiyelini etkileyebilir. McAnulty ve arkadaşlarının (2005a) yaptıkları bir çalışmada, tüketici egzersiz F2-izoprostanla ölçülen oksidatif strese artışla sonuçlanmış, karbonhidrat takviyesi ise kan antioksidan kapasitesini etkilememiş, F2-izoprostan seviyelerinde farklılık oluşturmamıştır.

Egzersizden sonraki toparlanma safhasında kandaki antioksidan seviyeleri yükselir, bunun üç açıklaması vardır: a) egzersizin sonlanmasıyla oksidan üretiminin yavaşlaması antioksidan savunmaya istirahat seviyelerine dönmesi için fırsat sağlar, b) endojen antioksidanların artışı ve/veya c) dokulardaki depolardan kana antioksidan mobilizasyonu egzersiz esnasında oksidan artışının sonucudur (Watson ve ark 2005).

Anaerobik egzersizde antioksidan savunma

Anaerobik egzersizin antioksidanlar üzerine etkisini araştıran çalışmalar aerobik egzersizlere kıyasla daha azdır. Bazı çalışmalarda (Ortenblad ve ark 1997, Childs ve ark 2001, İnal ve ark 2001) anaerobik egzersizden sonra plazmada ve kaslarda enzimatik antioksidan aktivitenin arttığı gösterilmiştir. Aralarında 2 dakikalık dinlenme dönemleri bulunan 30 saniye süreli 6 zorlu sıçrama egzersizi ile birçok antioksidan enzimin (SOD, GPx ve GR) önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Ortenblad ve ark 1997). Bu sonuçların aksine, Wingate testinin GPx aktivitesini etkilememesine rağmen SOD aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (Groussard ve ark 2003a). Yazarlara göre SOD aktivitesindeki azalma serbest radikal üretimindeki artışın bir sonucudur.

Anaerobik egzersizin non-enzimatik antioksidan seviyeleri üzerine etkileri ile ilgili sınırlı sayıda veri mevcuttur. Bununla birlikte, Wingate testinin plazma ürik asit ve C vitamini konsantrasyonlarını artırdığı, plazma A ve E vitamini

konsantrasyonlarını ise azalttığı gösterilmiştir (Groussard ve ark 2003b). Bu çalışmada (Groussard ve ark 2003b) GSH'da da azalma gözlenmiş, bu azalma C ve E vitamininin rejenerasyonu için kullanıldığı şeklinde yorumlanmıştır. Bunun aksine, bir çalışmada (Ramel ve ark 2004) yağda çözünen antioksidanların (A ve E vitamini) akut direnç egzersizinden sonra arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlardan dolayı, anaerobik egzersize non-enzimatik antioksidan cevabının daha iyi anlaşılması için daha fazla sayıda çalışmanın yapılması gereklidir.

Aerobik-anaerobik karışık egzersizlerde antioksidan savunma

Aerobik-anaerobik karışık egzersizlerin antioksidanlar üzerine etkisi hakkında net sonuçlar yoktur, var olan sonuçlar da tartışmalıdır. Rugby maçı sonrasında enzimatik antioksidan aktivitenin değişmediği gösterilmiştir (Chang ve ark 2002). Bu çalışmanın aksine, bazı çalışmalarda (Hellsten ve ark 1998, Hellsten ve ark 2001, Svensson ve ark 2002, Thompson ve ark 2003) aerobik-anaerobik karışık egzersizlerden sonra aerobik ve/veya anaerobik egzersizlere benzer şekilde ürik asit artışı ve GSH azalmasının olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, diğer non-enzimatik antioksidanların (A, E ve C vitaminleri) cevabı hakkında önemli bilgi eksikliği vardır.

Sonuç olarak, aerobik, anaerobik ve karışık egzersizler serbest radikal üretimini artırır. Hücre içinde ve plazmada çeşitli enzimatik ve non-enzimatik antioksidanların mobilizasyonunun artması ile adaptif cevap gelişir. Bununla birlikte, çoğu durumda antioksidan kapasite aşılarak oksidatif stres ortaya çıkar, bunun en önemli sebepleri egzersiz şiddetinin fazla ve süresinin uzun olması veya kişinin antrenman ve beslenme durumunun zayıf olmasıdır (Finaud ve ark 2006).

Antioksidan kısıtlamasının ve takviyesinin etkileri

Egzersizin neden olduğu oksidatif stresi önlemede antioksidan takviyesinin önemi pek çok çalışmada incelenmiştir. E vitamini, egzersizin neden olduğu lipid peroksidasyonunu azaltan antioksidanlar arasında en fazla çalışılmıştır (Kanter 1994). E vitamini takviyesinin farklı şiddetlerde ve sürelerde yapılan egzersizleri takiben lipid peroksidasyonu seviyelerini insanlarda ve sıçanlarda solunum havasında ve plazmada azalttığı gösterilmiştir (Dillard ve ark 1978, Sumida ve ark 1989, Meydani ve ark 1993, Goldfarb ve ark 1994). E vitamini kısıtlaması yapılan hayvanlarda egzersiz kapasitesinin yeterli E vitaminine sahip hayvanlara göre % 40 azaldığı iddia

edilmiştir (Davies ve ark 1982). Tiidus ve ark (1993) antrenmansız dişi sıçanlarda E vitamini eksikliği ve takviyesi arasında akut egzersizden sonraki kan laktat, hematokrit, hemoglobin, TBARS ve kreatin kinaz aktiviteleri bakımından fark olmadığını bulmuşlardır. Yüksek dozda E vitamininin (10.000 IU/kg diyet) sıçanlarda istirahatte ve tüketici egzersizden sonra iskelet kasındaki protein karbonil seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Reznick ve ark 1992). McBride ve ark (1998) direnç egzersizlerinin bir devresinden hemen sonra, 6 ve 24 saat sonra MDA seviyelerinin 3 katından daha fazla arttığını, E vitamini takviyesinin MDA artışını azalttığını ve direnç egzersizinden 6 saat sonra MDA'nın istirahat seviyelerine döndüğünü bulmuşlardır.

Bu sonuçların aksine, sporcularda F2-izoprostan seviyesinin egzersiz esnasında iki ay E vitamini takviyesi yapılan grupta % 181, plasebo grubunda % 97 arttığı gösterilmiştir (McAnulty ve ark 2005b). Watson ve ark (2005) antioksidandan zengin besinlerin az alınmasının istirahattaki F2-izoprostan seviyesini değiştirmezken egzersiz esnasında veya sonrasında artırdığını ortaya koymuşlardır.

Askorbik asit takviyesinin insanlarda 30 dakikalık submaksimal egzersizden sonra plazma TBARS konsantrasyonlarını azalttığı gösterilmiştir (Alessio ve ark 1997). Tek doz 1 gram askorbik asidin tükeninceye kadar yaptırılan inkremental egzersizden sonra sistemik serbest radikal üretimindeki artışı ve lipid peroksidasyonunu (Ashton ve ark 1999), 4 saatlik bir yarıştan sonra ise LDL oksidasyonuna karşı egzersizin neden olduğu hassasiyeti önlediği (Sanches-Quesada ve ark 1998) gösterilmiştir. Sıçanlarda 0,5 g/kg askorbik asit takviyesinin tüketici egzersizi takiben glutatyon oksidasyonunu önlediği gösterilmiştir (Sastre ve ark 1992).

Sıçanlarda tüketici egzersizin kanda ve akciğer dokusunda GSH oksidasyonunu artırdığı, bu artışın intraperitoneal N-asetil sistein (NAC) verilmesi ile önlediği (Sastre ve ark 1992, Sen ve ark 1994), lipoik asit takviyesinin ise karaciğer ve kanda GSH konsantrasyonunun azalmasını, iskelet kası, kalp ve karaciğerde TBARS seviyelerindeki artışı önlediği bildirilmiştir (Khanna ve ark 1999).

Selenyum GPx'in kofaktörüdür. Selenyum eksikliği GPx aktivitesinde azalmaya neden olur (Witt ve ark 1992). Bununla birlikte, selenyum takviyesi insanlarda GPx aktivitesini artırmasına rağmen eritrositlerde egzersizin neden olduğu GSSG'deki artışı etkilememiştir (Tessier ve ark 1995).

Tekli doymamış yağları fazla alan ve egzersiz yaptırılan sıçanlarda Mn-SOD aktivitesi yüksek bulunurken, lipid peroksidasyon seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Greathouse ve ark 2005). Bu antioksidanlara ilave olarak Shimomura ve ark (1991) koenzim Q10 takviyesinin sıçanlarda yokuş aşağı koşunun neden olduğu kas laktat dehidrogenaz ve kreatin kinaz salınımını azalttığını göstermişlerdir. Yeni bir çalışmada ise (Cooke ve ark 2008) insanlarda 14 günlük koenzim Q10 takviyesinin egzersizin neden olduğu MDA seviyelerindeki artışı azalttığı gösterilmiştir.

Sinerjik etkileri olabilecek iki veya daha fazla antioksidanın birlikte takviyesinin etkileri de araştırılmıştır (Suzuki 1990, Igarashi ve ark 1991). Okside antioksidanlar diğer antioksidanlar tarafından indirgenebilir. Örneğin askorbik asidin okside tokoferol ve ürik asidin geri dönüşümünü sağladığı (Packer ve ark 1979, Becker 1993), glutatyonun ise okside askorbik asidi indirgediği iddia edilmiştir (Deaton ve Marlin 2003). Antioksidanlar etki gösterdikleri bölgeler bakımından da farklılık gösterebilir. Örneğin; α -tokoferol lipitlerde süperoksit, hidroksil ve lipid peroksitler gibi serbest radikalleri kovucu etki gösterirken askorbik asit sulu ortamlarda önemlidir (Deaton ve Marlin 2003).

İnsanlarda α -tokoferol, askorbik asit ve β -karoten takviyesi submaksimal egzersizden sonra yükselen ekspire pentan ve serum MDA düzeylerini istirahat seviyelerine kadar düşürmüştür (Kanter ve ark 1993). Askorbik asit ve glutatyon takviyesi insanlarda tüketici egzersizden sonra kanda yükselen GSSG düzeyini azaltmıştır (Sastre ve ark 1992). Altı haftalık E ve C vitamini takviyesinin dayanıklılık egzersizinin neden olduğu lipid peroksidasyonunu önlediği, ama inflamatuvar belirteçler üzerine etkili olmadığı bulunmuştur (Mastaloudis ve ark 2004).

1.2.2. Düzenli Egzersizde Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma

Orta şiddetteki kronik egzersizler yüksek şiddetteki akut egzersizlere zıt etkiler gösterir. Toksikolojiden alınan bir terim olan “hormesis” bir maddenin düşük dozda iken faydalı, yüksek dozda veya konsantrasyonda iken zararlı olduğunu ifade eder ve bu terim egzersizin etkisini tanımlamak için de kullanılmaktadır (Ji ve ark 2006).

Düzenli egzersiz, akut egzersizin yol açtığı oksidatif stresi azaltarak adaptasyona neden olabilir. Antrenmana cevap olarak antioksidan enzim aktivitesinin artması, sistemin reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerine karşı korunmayı kolaylaştırmak için antioksidan oluşturma ihtiyacından dolayıdır. Çok hafif egzersiz adaptasyon sağlamada başarısız olur, çünkü oluşan reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türleri antioksidan savunma sistemi tarafından yeterince elimine edilir. Yeterli şiddet ve sürede tekrarlanan egzersizlerin biriken etkileri sonucunda adaptasyon gerçekleşir. Özetle, aerobik antrenmanlar egzersizin neden olduğu oksidatif stresi baskılamaya ilaveten antioksidan üretimini de uyarır (Bloomer ve Goldfarb 2004).

Düzenli egzersizde oksidatif stres

Aerobik antrenmanda oksidatif stres

Dayanıklılık antrenmanlarının egzersiz sonrası oksidatif stresi ve kas hasarını azalttığı pek çok çalışmada (Clarkson 1995, Tessier ve ark 1995, Vasankari ve ark 1997, Radak ve ark 1999, Leewenburgh ve ark 1999, Miyazaki ve ark 2001, Elosua ve ark 2003) gösterilmiştir. Bu bulgular düzenli aerobik egzersizin kansere ve hücre yaşlanmasına karşı mücadelede etkin rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, oksidatif stresteki bu azalmanın egzersizde serbest radikal üretiminin azalmasından mı yoksa antioksidan sistemin etkinliğinin artmasından mı kaynaklandığı henüz belirlenmemiştir.

Antrenmansız erkeklere 12 haftalık yorucu bir dayanıklılık antrenman programından önce ve sonra bisiklet ergometresinde egzersiz yaptırılmış ve yüksek şiddetteki dayanıklılık antrenmanının eritrositlerdeki antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı ve tüketici egzersize cevap olarak nötrofillerden süperoksit üretimini azalttığı gösterilmiş, antioksidan savunmadaki bu artışın eritrosit membranında egzersizin neden olduğu lipid peroksidasyonundaki azalma ile bağlantılı olduğu ileri

sürülmüştür (Miyazaki ve ark 2001). Konjuge dienler direnç egzersiziyle antrenmansız deneklerde artarken antrenmanlı deneklerde artmaz (Ramel ve ark 2004). Antrenmanlı bireylerde istirahatte plazma protein karbonil ve MDA düzeyleri antrenmansız bireylere kıyasla daha düşük bulunurken antrenmanlı kadınların plazma MDA düzeylerinin antrenmanlı erkeklere kıyasla daha düşük olduğu iddia edilmiştir (Bloomer ve Fisher-Wellman 2008).

Orta şiddetteki kronik egzersizler beyin, karaciğer, kalp ve böbrek dokusunda TBARS, protein karbonil ve mitokondriyal oksidasyon ürünlerini azaltır. Bu etki farelerde 24 haftalık antrenmandan sonra daha belirgindir (Navarro ve ark 2004). Sıçanlarda 4 hafta boyunca haftada 6 gün yaptırılan yüzme antrenmanının sağ ve sol ventrikülde MDA seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Ravi Kiran ve ark 2006). Bu sonuçların aksine, sedanter bireylerde 8 haftalık aerobik antrenman programından sonra uygulanan tüketici egzersizi takiben serum MDA ve protein karbonil düzeyleri antrenman yapmayanlara göre değişmezken kreatin kinaz seviyeleri bir miktar yükselmiştir (Rahmana ve ark 2007). Ultradayanıklılık antrenmanı yapan sporcularda istirahat MDA seviyeleri benzer fiziksel özelliklere sahip sedanterlere kıyasla düşüktür. Bu sporcularda egzersizden sonra ise serum MDA ve 8-Iso-PGF_{2α} seviyeleri yükselmiştir (Knez ve ark 2007, Skenderi ve ark 2008). Düzenli antrenman yapan erkek bisikletçilerde istirahat MDA seviyelerinin kontrollere kıyasla yüksek olduğu iddia edilmiştir (Lekhi ve ark 2007).

Anaerobik antrenmanda oksidatif stres

Anaerobik antrenmanın oksidatif stres üzerine etkisi ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. Bununla birlikte, anaerobik antrenmanlı bireylerin antrenmansız bireylere kıyasla istirahatte veya egzersizden sonra daha az oksidatif strese ve kas hasarına sahip oldukları gösterilmiştir (Ortenblad ve ark 1997, Selamoğlu ve ark 2000). Üstelik bu iyileşme dayanıklılık antrenmanı yapan sporcularla karşılaştırılabilir seviyededir (Selamoğlu ve ark 2000). Bununla birlikte, anaerobik antrenman protokolünü takiben oksidatif stresde azalma bulamayan çalışmalar da mevcuttur (Rall ve ark 2000, Vincent ve ark 2002). Çalışmalar arasındaki bu farklılıklar metodolojik farklılıklar (popülasyonun özellikleri, antrenman protokolleri ve biyolojik ölçümler) ile kısmen açıklanabilmektedir.

Aerobik-anaerobik karışık antrenmanlarda oksidatif stres

Karışık antrenmanların oksidatif stres üzerine etkisini araştıran az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalar (Chang ve ark 2002, Cazzola ve ark 2003, Metin ve ark 2003), antrenmanlı futbol veya rugby oyuncularının istirahatte sedanterlere kıyasla daha az oksidatif strese sahip olduklarını göstermiştir. Rugby karşılaşmasından sonra antrenmanlı sporcularda oksidatif stres artışı daha az antrenmanlı sporculara kıyasla daha azdır (Chang ve ark 2002). Yani antrenman seviyesi bu tip aktivitelerdeki oksidatif stres üzerine önemli etkiye sahiptir.

Düzenli egzersizde antioksidan savunma: Antioksidan kısıtlamasının ve takviyesinin etkileri

Aerobik antrenmanda antioksidan savunma

Aerobik antrenmanların antioksidan enzimler üzerine etkileri kas, plazma, karaciğer ve kalpte incelenmiştir (Venditti ve Di Meo 1997, Chevion ve ark 2003). Kaslarda güçlü oksidasyon kapasitesine sahip özgün bir antioksidan enzim adaptasyonunun bulunduğu ve bunun büyük kısmının Tip 1 liflerine bağlı olduğu iddia edilmiştir (Hollander ve ark 1999, İnal ve ark 2001). Plazma ve diğer dokularda ise kontrollü bir dayanıklılık antrenmanı protokolünden sonra antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir (Marzatico ve ark 1997, Selamoğlu ve ark 2000, Miyazaki ve ark 2001, Elosua ve ark 2003). Bununla birlikte, adaptasyonun bu çalışmalarda gözlenen VO_{2max} artışı ile korele olmadığı ve SOD ve GPx'deki artışın CAT'a kıyasla daha fazla olduğu gösterilmiştir (Ohno ve ark 1988, Hollander ve ark 1999, Powers ve ark 1999, Miyazaki ve ark 2001).

Ultradayanıklılık antrenmanı yapan sporcularda istirahatte eritrosit CAT ve GPx aktiviteleri benzer fiziksel özelliklere sahip sedanter kontrollere kıyasla daha yüksektir. Bu sporcularda egzersizden sonra eritrosit SOD, GPx ve CAT aktivitelerinin azaldığı iddia edilmiştir (Knez ve ark 2007). Bu sonuçların aksine, düzenli antrenman yapan erkek bisikletçilerde istirahatte E ve C vitamini, SOD ve ürik asit seviyelerinin kontrollere kıyasla yüksek, katalaz aktivitesinin ise düşük olduğu iddia edilmiştir (Lekhi ve ark 2007).

Şiddetli egzersizleri takiben oksidatif hasar olduğu uzun yıllardan beri bilindiğinden egzersiz yapan kaslarda antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

dikkat gerektirmektedir (Davies ve ark 1982, Ji 2001, Cooper ve ark 2002, Gomez-Cabrera ve ark 2005). SOD'nin mitokondriyal ve sitozolik izoformları olan Mn-SOD ve Cu,Zn-SOD'nin orta şiddette kronik egzersizden sonra veya tekrarlanan yüksek şiddette egzersizlerden sonra kaslarda arttığı bildirilmiştir. Diğer antioksidan enzimlerin ise benzer artışı göstermediği iddia edilmiştir (Navarro-Arevalo ve ark 1999, Ji 2002, Banerjee ve ark 2003).

Düzenli antrenmanın SOD ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırmak suretiyle oksidatif stresin zararlı etkilerini ortadan kaldırdığı gösterilmiş, bu artışın antioksidan enzimlerin mitokondriyal biyosentezini uyaran serbest radikal miktarındaki artışın sonucu olduğu ileri sürülmüştür (Greathouse ve ark 2005). İki temel antioksidan enzim olan mitokondriyal SOD ve sitozolik GPx aktivitesi antrenman yapan hayvanlarda yapmayanlara göre önemli ölçüde yüksek bulunmuş, CAT ve sitozolik SOD'de ise küçük bir farklılık gözlenmiştir (Leeuwenburgh ve Heinecke 2001). Hellsten ve ark (1996) şiddete ilave olarak antrenman hacminin de antioksidan enzim aktivitelerinin adaptasyonunda önemli olduğunu göstermişlerdir. Sporcularda 90 günlük antioksidan takviyesinin submaksimal testten sonra lenfosit CAT aktivitesinde belirgin adaptasyona neden olduğu bulunmuştur (Tauler ve ark 2006). Antrenmanlı denekler sedanter bireylerden daha yüksek eritrosit antioksidan enzim aktivitesi gösterirler (Robertson ve ark 1991). Başlangıç antrenman durumu, antrenman protokolü ve sporcunun beslenme durumu gibi birçok faktörün bazal eritrosit antioksidan enzim aktivitelerini etkilediği bilinmektedir (Tauler ve ark 2006). 6.5 hafta kronik treadmill egzersizinden sonra sıçanların beyin TBARS seviyelerinde önemli bir değişiklik gözlenmezken antrenman periyodu esnasında C vitamini takviyesi yapılan sıçanlarda beyin TBARS seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir (Coşkun ve ark 2005). Kütle başına oksijen tüketimi ve oksidan oluşumu en fazla organ olan kalp, karaciğere kıyasla 4 kat daha az SOD aktivitesine sahiptir ve CAT aktivitesi de düşüktür (Somani ve ark 1995b). Karanth ve ark (2004) doymamış yağ içeren diyetin yüzme egzersizinden sonra sadece karaciğerdeki lipid peroksidasyonunu biraz artırdığını, düzenli egzersiz yaptırılan sıçanların kaslarında (muhtemelen artan GSH seviyelerinden dolayı) bu artışın daha az olduğunu göstermişlerdir.

Dayanıklılık antrenmanlarının sıçanların hem iskelet hem de kalp kaslarında egzersizin neden olduğu oksidatif hasara karşı antioksidan enzim aktivitelerini artırarak koruma sağladığı gösterilmiştir (Powers ve ark 1993, Powers ve ark 1994, Leeuwenburgh ve ark 1994, Leeuwenburgh ve ark 1997). Leeuwenburgh ve ark (1994) 10 haftalık egzersiz programının vastus lateralis kasında GPx ve SOD aktivitelerini artırdığını göstermişlerdir. Dayanıklılık antrenmanı yapan sıçanlarda bu kasın glutatyon içeriğinde % 33 artış olduğu, antrenman yapan sıçanların kontrollere kıyasla % 62 daha fazla GPx ve % 27 daha fazla SOD aktivitesine sahip oldukları gösterilmiştir (Leeuwenburgh ve ark 1997). Powers ve ark (1994) kas antioksidan enzimlerinde egzersizin neden olduğu artışın kasa özgün olduğunu göstermişlerdir. Sıçanlarda 10 hafta boyunca, haftada 5 gün/60 dakika % 5 eğitimde antrenmanın soleus kasında total NOS ve HSP90 seviyelerini artırdığı gösterilmiştir (Harris ve ark 2008). Yüksek ve orta şiddette antrenmanın ventrikül kasında SOD aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Powers ve ark 1993). Sıçanlarda 4 hafta boyunca haftada 6 gün yüzme antrenmanının sağ ve sol ventrikül Mn-SOD aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Ravi Kiran ve ark 2006).

Dayanıklılık antrenmanlarının non-enzimatik antioksidanlar üzerine etkisi halen tartışmalıdır. Bazı çalışmalar (Margaritis ve ark 1997, Child ve ark 1999) antioksidan adaptasyonunun antrenman hacmi veya VO_{2max} ile korele olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, adaptif cevabı oluşturabilmek için antrenman protokolü yeterli sürede ve şiddette olmalıdır (Miyazaki ve ark 2001). Örneğin 8 haftalık bir antrenman protokolü antioksidan potansiyeli artırmaksızın VO_{2max} 'ı artırır, oysa 10 haftalık bir protokol (daha uzun ve şiddetli) VO_{2max} 'ı ve bazı antioksidanların aktivitelerini artırır (Tessier ve ark 1995, Tiidus 1998). 6 hafta boyunca haftada 3 gün 40'ar dakika egzersiz yapan bireylerde GSH seviyeleri artarken GSSG seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (Elokda ve Nielsen 2007).

Sıçanlarda 8 haftalık koşu egzersizinin yavaş kas liflerinde MDA, protein karbonil ve ubikinon seviyelerini artırıp glutamin sentetaz aktivitesini ve askorbik asit seviyelerini azalttığı, hızlı kas liflerinde MDA seviyesini ve glutamin sentetaz aktivitesini artırırken askorbik asit ve α -tokoferol seviyelerini azalttığı, kalpte MDA seviyesini artırdığı, karaciğerde protein karbonil, sistein ve sistin seviyelerini,

glutamin sentetaz aktivitesini azalttığı, beyinde askorbik asit seviyesini artırırken MDA seviyesini azalttığı gösterilmiştir (Liu ve ark 2000).

Anaerobik antrenmanda antioksidan savunma

Anaerobik antrenmanlı bireylerin dokuları ve özellikle de çalışan kasları daha yüksek antioksidan enzim aktivitesine sahiptir (Hellsten ve ark 1996, Ortenblad ve ark 1997, Marzatico ve ark 1997, Vincent ve ark 2002). Bazı çalışmalarda (Selamoğlu ve ark 2000) bu iyileşme gösterilmemiştir. Sonuçlar arasındaki farklılık egzersiz şiddeti ve antrenman protokolü ile açıklanabilir. Aslında aerobik antrenmanlarda olduğu gibi protokolün süresi de önemlidir; çünkü adaptasyon en az 4-6 haftalık yoğun bir antrenmandan sonra gerçekleşir (Hellsten ve ark 1996).

Non-enzimatik antioksidan konsantrasyonlarının anaerobik antrenmanlarla arttığı görülmektedir (Cazzola ve ark 2003). Cazzola ve arkadaşlarına (2003) göre bu adaptasyon kas düzeyinde bu tip egzersizin neden olduğu iskemi/reperfüzyon ve enflamasyon esnasında serbest radikal üretiminin bir sonucudur.

Aerobik-anaerobik karışık antrenmanlarda antioksidan savunma

Çalışmalar futbol ve rugby oyuncularında enzimatik antioksidan sistemlerin arttığını göstermiştir (Brites ve ark 1999, Evelson ve ark 2002, Chang ve ark 2002, Cazzola ve ark 2003, Metin ve ark 2003). Bu sonuçlar düşük antrenman seviyesine sahip bireylere ilave olarak sporcularda da doğrulanmıştır (Cazzola ve ark 2003, Brites ve ark 1999). Karışık antrenmanlar total antioksidan kapasiteyi ve C vitamini, E vitamini veya ürik asit gibi bazı non-enzimatik antioksidanların seviyelerini de artırır (Brites ve ark 1999, Evelson ve ark 2002, Cazzola ve ark 2003). Böylece, antioksidan sistemdeki iyileşme sporcuları oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı korur. Bununla birlikte, antrenman ve antrenman yükünün artması basketbol oyuncularında gösterildiği gibi zıt etkilere de neden olabilir (Schröder ve ark 2000). Çalışmalar arasındaki farklılık beslenme durumu ile açıklanabilir. Futbolcular beslenme ile yeterli antioksidan takviyesi alırken basketbolcuların beslenme durumu çalışma boyunca kontrol edilmemiştir.

Antrenman yükü ve oksidatif stres arasındaki ilişki

Oksidatif stres ve antioksidan durum belirteçleri biyolojik takipte önemlidir. Elit bisikletçilerde GPx aktivitesinin antrenman boyunca arttığı ve geri dönüşüm

durumunda ise azaldığı gösterilmiştir (Finaud ve ark 2006). Yoğun antrenman periyotlarında plazma selenyum konsantrasyonunda ve GPx aktivitesinde azalma olduğu gösterilmiştir. Profesyonel Amerikan futbolcularında sezon boyunca antioksidan sistemin etkinliğinin azaldığı ve oksidatif stresin arttığı gözlenmiştir (Schippinger ve ark 2002). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, yoğun antrenman periyotları esnasında oksidatif stres artabilir. Pincemail ve ark (2000) elit futbol ve basketbol oyuncularının yarısında düşük antioksidan durumu ve yüksek oksidatif stres göstermişlerdir. Bu durum bireysel olarak düşük antioksidan alımına ve antrenmanların ve karşılaşmaların sıklığı (antioksidanların kullanımında ve mobilizasyonunda artışa yol açar) ile açıklanmıştır.

Sonuç olarak, antrenmanın neden olduğu antioksidan savunmadaki artış ve oksidatif stresteki azalma literatürde geniş şekilde araştırılmıştır. Aerobik, anaerobik ve karışık antrenmanlar oksidatif stresin azalmasına sebep olur. Bununla birlikte, antioksidan sistemin adaptif cevabının tetiklenebilmesi ve oksidatif stresin azalması için antrenman programının yeterli derecede uzun ve yoğun olması gereklidir. Kişinin antrenman seviyesi çalışmanın başlangıcında düşük olduğu zaman bu adaptasyon daha da önem kazanır.

1.3. Üzüm Çekirdeği Ekstresi

Dünya Sağlık Örgütü'nün 1989 yılında Fransa'nın Toulouse şehrinde yaptığı epidemiyolojik çalışmada, yüksek oranda doymuş yağ tüketmelerine rağmen bu kentte yaşayanlarda kolesterol ve benzer risk faktörleriyle ilişkili koroner kalp hastalıklarına bağlı ölümlerin Amerika ve İngiltere gibi ülkelere kıyasla önemli ölçüde daha düşük olduğu bulunmuş ve bu enteresan olay "Fransız Paradoksu" olarak adlandırılmıştır (Renaud ve de Lorgeril 1992). Yüksek yağ içeren diyetle beslenmelerine, az egzersiz yapmalarına ve sigara içmelerine rağmen Fransa'daki kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölümler ABD'ye ve diğer batı ülkelerine kıyasla daha azdır (Renaud ve de Lorgeril 1992, Belleville 2002). Epidemiyolojik çalışmalardan derlenen veriler kırmızı şarap tüketiminin faydalı etkiler sağladığını göstermiştir (Kar ve ark 2006). Bu konuyla ilgili sonraki çalışmalar (Demrow ve ark 1995, Miyagi ve ark 1997, Stein ve ark 1999, Freedman ve ark 2001) kırmızı şarabın içerdiği flavonoidlerin antioksidan etkisinin bu kardiyovasküler yarara katkıda

bulduğunu göstermiştir. Kırmızı şarapta bulunan resveratrol ve oligomerik proantosiyanidinler gibi polifenolik içeriklerin Fransız paradoksunun temelini oluşturduğunu gösterilmiştir (Belleville 2002, Sun ve ark 2002).

1.3.1. Polifenoller ve Flavonoidlerin Genel Özellikleri

Polifenolik bileşikler hemen hemen bütün bitkilerde bulunan ve insanlarda diyetin önemli bir kısmını oluşturan maddelerdir. Doğal polifenoller fenolik asit gibi basit moleküllerden tanenler gibi yüksek derecede polimerize bileşiklere kadar değişiklik gösterebilir. Polifenoller bitki kaynaklı besinlerin tadından ve kalitesinden sorumludur. Yiyeceklerin ve içeceklerin tadındaki keskinlik ve acılık, içerdikleri polifenolik bileşiklere bağlıdır. Polifenoller temel kimyasal yapılarına göre en az 10 farklı gruba ayrılır (Bravo 1998). Bu gruplara, basit fenoller, fenolik asitler, kumarinler, ksantonlar, stilbenler, flavonoidler ve ligninler örnek olarak verilebilir.

Bitki fenolleri içerisinde flavonoidler en geniş ve en iyi bilinen gruptur. Flavonoidler, polifenollerin alt grubudur ve sebzelerde, meyvelerde, kabuklu yemişlerde ve çekirdeklerde bulunurlar. Flavonoidler 15 karbon atomundan meydana gelirler ve ortak yapılarında difenilpropan (C6-C3-C6) ve üç karbonla bağlanmış 2 aromatik halka bulunur (Bravo 1998). Flavonoid içeren 5000'den fazla bileşik 13 alt grupta tanımlanmıştır (Bravo 1998). Bu gruplar;

1. Kalkonlar
2. Dihidroalkonlar
3. Auronlar
4. Flavonlar
5. Flavonoller
6. Dihidroflavonol
7. Flavononlar
8. Flavonol (Flavon-3-oller)
9. Flavondiol (Lökoantosiyanidin)
10. Antosiyanidinler
11. İzoflavonoidler
12. Biyoflavonoidler

13. Proantosiyandinler veya kondens tanenlerdir.

Flavonoid gruplarından birisi de kondens tanenler veya proantosiyandinlerdir. Tanenler genellikle meyve ekstralarında bulunan ve hayvanlarda deride bulunan proteinleri presipite ederek derinin sertleşmesini sağlayan maddelerdir (Cos ve ark 2004). Kondens tanenler veya proantosiyandinler büyük moleküler ağırlıklı polimerlerdir. Proantosiyandinler, genellikle flavon-3-ol olan nükleofilik flavonil ünitelerinin (kateşin, epikateşin gibi) elektrofilik flavonil üniteleri olan flavon-4-ol veya flavon-3,4-diol ile birleşmesiyle meydana gelir (Cos ve ark 2004). Proantosiyandinler, flavon-3-ollerin oligomer ve polimerleridir ve bu üniteler temel olarak C4-C8 bağlarıyla bağlanmalarına rağmen C4-C6 bağları da mevcuttur. Bu bağların her ikisi de B-tipi bağ olarak adlandırılır. C2-C7 arasında ilave bir eter bağı ile bağlanırsa çift bağı flavon-3-ol üniteleri A-tipi bağ olarak adlandırılır (Santos-Buelga ve Scalbert 2000). Proantosiyandinler hidroksilasyon durumlarına göre prosiyanidinler, prodelfinidinler, propelargonidinler, profisetinidinler, prorobinetinidinler, proguibourtinidinler, proterakaşinidinler ve promelakasiner gibi birçok alt gruba ayrılır (Cos ve ark 2004).

Proantosiyandinler ligninden sonra ikinci önemli doğal fenollerdir (Rasmussen ve ark 2005). Besinlerdeki proantosiyandin içeriğini hesaplamak zordur, çünkü proantosiyandinler geniş aralıkta yapıya ve moleküler ağırlığa sahiptirler (de Pascual-Teresa ve ark 2000). Proantosiyandinlerin en iyi bilinen biyokimyasal özellikleri proteinlere bağlanabilme ve onları denatüre edebilmeleridir. Proantosiyandinler ile prolin/hidroksiprolin zengin proteinler ve diğer polimerler arasındaki ilişki çok güçlüdür, böylece bu maddelerin tabaklama üzerine etkileri açıklanmaktadır (hayvan derisinde bulunan bir protein olan kollajen, prolin ve hidroksiprolinden zengindir) (Beecher 2004). Tükürükteki proteinler ile kompleks oluşturarak kondens tanenler meyvenin tadındaki keskin karakteri (üzüm) ve çikolatadaki acı tadı oluştururlar (Santos-Buelga ve Scalbert 2000).

Proantosiyandinler bitkilerin ikincil metabolitleridir. Bu yüzden organizmanın yapısal ve metabolik bütünlüğü için gerekli değildir. Bununla birlikte, bitkileri mikroplar, mantarlar ve hayvanlar gibi zararlı düşmanlardan korumak gibi çeşitli biyolojik aktiviteler gösterirler (Beecher 2004). Üzüm çekirdeği ekstresindeki

ana bileşik, monomer olarak adlandırılan proantosiyanidin alt ünitelerinden meydana gelen oligomerik proantosiyanidinlerdir. Temel olarak kateşin ve epikateşin olarak adlandırılan 2 proantosiyanidin monomeri vardır. Bunlardan dimer, trimer ve diğerleri oluşur (Hagerman ve ark 1998).

Proantosiyanidinlerin antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuvar, antialerjik ve vazodilatatör etkilerinin olduğu bilinmektedir (Rice-Evans ve ark 1996, Chen ve ark 1996). Proantosiyanidinlerin lipid peroksidasyonunu, trombosit agregasyonunu, kapiller permeabiliteyi, fragilitiyi inhibe ettiği de gösterilmiştir (Rice-Evans ve ark 1996). Proantosiyanidinler siklooksijenaz, lipooksijenaz, protein kinaz C, anjiyotensin dönüştürücü enzim, hiyaluronidaz ve sitokrom P450 aktivitelerini modüle ederler (Rice-Evans ve ark 1996, Chen ve ark 1996).

1.3.2. Polifenolik Bileşiklerin Sindirim ve Emilimi

Polifenollerin absorpsiyonu hakkında bilinenler sınırlıdır. Besinlerdeki fenollerin absorpsiyonunu ve metabolizmasını belirleyen birincil olarak kimyasal yapılarıdır. Büyük miktarda proantosiyanidin içeren bir besin alındığı zaman gelişen ilk cevap aşırı hassasiyettir. Bunun nedeni kısmen diyetle alınan maddelerin prolinden zengin tükürük proteinlerine bağlanmasıdır (Beecher 2004).

Besinlerde büyük miktarlarda bulunmalarına rağmen proantosiyanidinlerin emilimi çok sınırlıdır, gastrointestinal kanalda lokal etki gösterebilir veya mikrobiyal parçalanma yoluyla oluşan basit fenolik asitlere ve monomerik formlara dönüşebilirler (Halliwell ve ark 2000). Üzüm çekirdeği ekstresinin kullanıldığı ilk çalışmalarda (Santos-Buelga ve Scalbert 2000), proantosiyanidinlerin sıçan ve fareler tarafından absorbe ve metabolize edildiği bildirilmiştir. Sonraki çalışmalarda saflaştırılmış proantosiyanidin fraksiyonlarının veya üzüm çekirdeği ekstresinin emiliminin sıçanlarda (Donovan ve ark 2002, Nakamura ve Tonogai 2003), tavuklarda ve koyunlarda (Santos-Buelga ve Scalbert 2000) olmadığı iddia edilmiştir. Birkaç çalışmada (Baba ve ark 2002, Tanaka ve ark 2003) ise saflaştırılmış dimerlerin sıçanlarda sınırlı şekilde absorbe edildiği gösterilmiştir. İnsanlarda bağırsak epitelinin in vitro modeli olan caco-2 hücre kültüründe yapılan çalışmada (Deprez ve ark 2001) radyoaktif olarak işaretlenmiş prosiyanidin dimer ve

trimerlerinin tek katmanlı hücre zarı boyunca taşınabildiği, oysa daha yüksek polimerlerin epitelyal hücrelere adsorbe olduğu ve permeabilitenin büyük ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Bir çalışmada (Spencer ve ark 2000) prosiyanidinlerin mide suyuna maruz bırakılması sonucunda oligomerlerin zamana bağlı olarak epikateşin monomer ve dimerlerinin karışımına ayrıştığı gösterilmiştir. İnsanlarda, flavonoid zengin kakao ve proantosiyanidin zengin üzüm çekirdeği ekstresi tüketiminden sonra dimerik proantosiyanidinlerin plazmada gösterilmesi, ancak daha yüksek polimerlerin bulunmaması bu sonuçları desteklemektedir (Holt ve ark 2002, Sano ve ark 2003). Polimerik yapısı ve yüksek moleküler ağırlığından dolayı proantosiyanidinler pek çok bitki polifenollerinden farklıdır. Bu özellik bağırsak bariyeri yoluyla emilimlerini kısıtlar ve trimerlerden daha büyük oligomerlerin kendi doğal formları ile emilimleri olanaksız hale gelir (Manach ve ark 2004).

Çoğu polimerik proantosiyanidin ince bağırsağa kadar herhangi bir değişime uğramadan geldiği, buradan sonra çekum ve kalın bağırsaktaki mikroflorada küçük fenolik asitlere parçalandığı iddia edilmiştir (Manach ve ark 2004). Monomerik polifenollerin alt gastrointestinal kanal mikroflorasındaki metabolizması geçmiş yıllarda araştırılmış, benzer kavram proantosiyanidinlerin metabolizması için de uygulanmıştır (Beecher 2004). Deprez ve ark (2000) tarafından yapılan bir in vitro çalışmada insan kolon mikroflorasında anoksik ortamda 10 saatlik inkübasyonla yarı saflaştırılmış proantosiyanidinlerin yaklaşık % 50'sinin, 48 saatlik inkübasyondan sonra ise tamamının ayrıştığı gösterilmiştir. Bu inkübasyonun birincil ürünlerinin, monomerik flavonoidlerin metabolizma ürünlerine benzer şekilde fenilasetik, fenilpropionik ve fenilvalerik asitlerin monohidroksile türevleri olduğu gösterilmiştir (meta ve para izomerler). Diğer insan çalışmalarında kakao proantosiyanidinlerinin midedeki yüksek asit ortamdan geçişi boyunca stabil kaldığının (Rios ve ark 2002) ve sonrasında birçok fenolik asidin üriner atılımının arttığının gösterilmesi (Rios ve ark 2003), alt gastrointestinal kanaldaki metabolizmasının yaygın olduğunu düşündürmektedir. Radyoaktif olarak işaretlenmiş proantosiyanidinlerin trimer ve daha yüksek oligomerleri farelerde oral proantosiyanidin takviyesinden sonra çeşitli organlarda belirlenmiştir, ama insanlarda benzeri bilimsel deliller eksiktir (Beecher 2004). Proantosiyanidin takviyesinden 15 dakika ila 1 saat sonra proantosiyanidin metabolitlerinin plazmada görüldüğü iddia edilmiştir (Da Silva ve ark 1998, Koga ve ark 1999).

Polifenollerin alt gastrointestinal kanaldaki lokal aktiviteleri önemlidir, çünkü bağırsaklar okside edici ajanlara maruz kalabilir ve bu da inflamasyon ve kanser gibi pek çok hastalığa sebep olabilir (Halliwell ve ark 2000). Kolondaki polifenol konsantrasyonları litrede birkaç yüz mikromole ulaşabilir ve az sayıdaki karotenoid ile birlikte polifenoller kolonda bulunan ender antioksidanlardır, çünkü E ve C vitamini gibi antioksidanlar bağırsağın daha üst segmentlerinde absorbe edilir (Scalbert ve Williamson 2000). Bazı araştırmacılar kırmızı şaraptaki alkolün varlığında polifenollerin solubilitésinin ve dolayısıyla bağırsaklardaki emiliminin arttığını iddia etmişlerdir (Manach ve ark 2004). Bununla beraber, insanlarda kateşin metabolitlerinin plazma konsantrasyonları kırmızı şarap veya alkolü alınmış kırmızı şarap tüketiminden sonra farklı bulunmamıştır (Donovan ve ark 1999).

1.3.3. Polifenolik Bileşiklerin Biyoyararlanımı ve Metabolizması

Vejetaryen veya Akdeniz diyeti gibi meyve ve sebzeden zengin diyetler büyük miktarda polifenol içerir (Urquiaga ve Leighton 2000). Gu ve ark (2004) Amerika'da günlük proantosiyanidin alımının monomerler hariç 53,6 mg/gün, monomerler dahil 57,7 mg/gün olduğunu hesaplamışlardır.

Polifenollerin metabolizmasından sorumlu temel organ karaciğerdir. Bununla birlikte, polifenol metabolizmasından sorumlu enzimleri içerdikleri için böbreklerin veya bağırsak mukozasının da bu olayda rol aldığı düşünülmektedir (Bravo 1998). Proantosiyanidinler veya fermentasyon ürünleri intestinal bariyeri geçtikten sonra portal dolaşım yoluyla karaciğere ulaşır ve burada metabolize olurlar (Rasmussen ve ark 2005). Polifenollerin tamamı aynı hızda ve oranda absorbe edilmemektedir. Kimyasal yapılarına bağlı olarak diyetle alınan polifenollerin eliminasyonunda ve absorpsiyonunda hız ve oran bakımından önemli farklılıklar vardır (Bravo 1998).

Proantosiyanidinlerin biyoyararlanımı çeşitli çalışmalarda (Deprez ve ark 2000, Spencer ve ark 2000, Deprez ve ark 2001, Baba ve ark 2002, Rios ve ark 2002) rapor edilmiştir. Proantosiyanidinler metal iyonları ile kompleks oluşturur, böylece çinko ve demir gibi eser elementlerin biyoyararlanımını azaltırlar (Matuschek ve ark 2001). Emildikten sonra polifenoller 3 tip konjugasyona uğrarlar: Metilasyon,

sülfasyon ve glukuronidasyon (Wu ve ark 2002). Albumin polifenollerin bağlandığı temel proteindir. Polifenollerin albumine affinitesi kimyasal yapılarına göre değişir. Albumine bağlanma derecesi metabolitlerin klirens hızı ile ilişkilidir (Manach ve ark 2004).

Polifenoller fare ve sıçanlarda beyin, endotel hücresi, kalp, böbrek, dalak, pankreas, prostat, uterus, ovaryum, meme bezleri, testis, mesane, kemik ve deri gibi pek çok dokuda HPLC ile belirlenmiştir. Büyük konjuge polifenol metabolitleri safra yoluyla, monosülfatlar gibi küçük konjugeler tercihen idrar ile atılır. Polifenoller safra yoluyla duodenuma salgılanır ve geri emilebilecekleri yer olan bağırsağın distal segmentinde bakteriyel enzimlerin, özellikle de β -glukuronidazın etkisine maruz kalırlar. Bu enterohepatik döngü polifenollerin vücutta daha uzun süre kalmasına yol açar (Manach ve ark 2004).

1.3.4. Polifenollerin Antioksidan Aktivitesi

Epidemiyolojik çalışmalar artan fenolik antioksidan tüketimi ile kardiyovasküler hastalık riskinin (Hertog ve ark 1993, Hertog ve ark 1995, Hertog ve ark 1997) ve bazı kanser tiplerinin görülme sıklığının (Hertog ve ark 1994, Hertog ve ark 1995) azalması arasında korelasyon olduğunu göstermektedir. Fenolik antioksidanlar radikallere hızlı bir şekilde hidrojen iyonu vererek lipidlerin ve diğer moleküllerin oksidasyonuna engel olurlar (Bravo 1998). Bununla birlikte, yüksek konsantrasyondaki fenolik antioksidanlar yüksek pH, ortamda büyük miktarda demir varlığı gibi durumlarda otooksidasyon sürecini başlatarak prooksidanlar gibi davranabilirler (Shahidi ve Wanasundara 1992).

Polifenollerin antioksidan bileşik olarak etkinlikleri, büyük ölçüde kimyasal yapılarına bağlıdır. Fenollerin kendileri antioksidan olarak inaktiftir ama ortho- ve para- difenolikleri antioksidan etkiye sahiptir (Shahidi ve Wanasundara 1992). Flavonoidler en güçlü bitki antioksidanları arasındadır, çünkü antiradikal aktiviteden sorumlu aşağıdaki yapısal elemanlardan bir veya daha fazlasını içerirler:

1. o-difenolik grup (B halkasında),
2. 4-oxo fonksiyonu ile konjuge 2-3 çift bağ,

3. 3 ve 5 pozisyonunda hidroksil grupları (Bravo 1998).

Flavonoidler hidroksil ve peroksil radikallerinin güçlü kovucusudur, bununla birlikte süperoksit radikalini kovucu etkileri net değildir (Bravo 1998). Polifenoller metal şelatörüdür ve aktif oksijen radikallerinin önemli kaynağı olan Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarını inhibe ederler (Fuhrman ve ark 1995). Flavonoidler serbest radikal kovucu kapasitelerini metal iyonları ile kompleks oluşturduktan sonra da korurlar (Afanas'ev ve ark 1989). Ekstrakte edilemeyen polifenollerin (polimerik proantosiyanidinler ve yüksek moleküler ağırlıklı hidrolize olabilen tanenler) basit fenollere kıyasla peroksil radikallerini yok etmede 15-30 kat daha etkili olduğu ileri sürülmüştür (Hagerman ve ark 1998). Bu bileşikler absorbe edilmedikleri için antioksidan aktivitelerini sindirim kanalında göstererek lipidler, proteinler ve karbonhidratları sindirim esnasında oksidatif hasardan korur ve böylece E ve C vitamini gibi çözünebilir antioksidanların tükenmesini engellerler (Bravo 1998).

Polifenollerin antioksidan etkinliği bu maddelerin emilimine, metabolizmasına ve plazmadaki konjuge ve metoksi formlarına bağlıdır (Bravo 1998). Daha önce bahsedildiği gibi, polifenollerin sadece küçük bir kısmı absorbe edilir. Bununla birlikte, bu düşük konsantrasyon in vivo olarak güçlü antioksidan etki göstermeleri için yeterli görünmektedir. Bu sonuçlar insan çalışmalarında (Serafini ve ark 1994, Serafini ve ark 1996) ve epidemiyolojik verilerle de (Hertog ve ark 1993, Hertog ve ark 1994, Hertog ve ark 1995, Hertog ve ark 1997) gösterilmiştir. Wiswedel ve ark (2004) kakaoda bulunan proantosiyanidinlerin zorlu fiziksel egzersizin neden olduğu lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermişlerdir.

Bunlara ilaveten, antioksidan polifenoller, temel olarak da flavonoidler LDL oksidasyonunun güçlü inhibitörüdür (Frankel ve ark 1993, Fuhrman ve ark 1995). Flavonoidlerin koruyucu etki göstermesinde ileri sürülen mekanizmalar:

1. Serbest radikal oluşumunu azaltması,
2. LDL oksidasyonunda alfa-tokoferolün korunması,
3. Okside alfa-tokoferolün rejenerasyonu,
4. Metal iyon şelatörü olmasıdır (Bravo 1998).

1.3.5. Üzüm ve Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Genel Özellikleri

Üzümün (*Vitis vinifera*) tıbbi ve besinsel değeri binlerce yıldır bilinmektedir. Mısırlılar bu meyveyi yaklaşık 6000 yıldır tüketmektedir ve birçok antik Yunan filozofu üzümün iyileştirici etkisinden bahsetmiştir. Üzümün genel bileşimi Çizelge 1.3’de verilmiştir (Kar ve ark 2006).

Çizelge 1.3. Üzümün genel bileşimi (Kar ve ark 2006).

Sap	% 2-6
Kabuk	% 5-12
Su	% 80-90
Çekirdek	% 0-5

Üzüm çekirdeği, üzümün ağırlığının küçük bir kısmını oluşturmaya rağmen ekstrakte edilebilen fenollerin üçte ikisini içerir. Çekirdek en fazla fenol içeriğine sahiptir ve ağırlığının % 5-8’i kadar fenol içerebilir (Kar ve ark 2006). Üzümün yetiştiği bölgenin iklimi, üzüm kabuğunun kalınlığı, üzümün hasat zamanı gibi faktörler flavonoid içeriğini etkiler (Rappart ve Lockwood 2001).

Üzüm çekirdeği ekstresi (GSE) kırmızı üzüm çekirdeğinden standardize edilmiş su-etanol karışımıyla ekstrakte edilir. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi ile birlikte yapılan HPLC çalışmaları GSE’nin monomerik, dimerik, trimerik, tetramerik ve diğer oligomerik proantosiyanidin biyoflavonoidlerini içerdiğini göstermiştir (Bagchi ve ark 2000). Kateşinler ve oligomerik proantosiyanidinler, üzümün odunlaşmış kısımlarında, özellikle de çekirdeğinde bulunur (Kovac ve ark 1995). GSE’de belirlenen flavon-3-oller (+)-kateşin, (-)-epikateşin ve (-)-epikateşin-*O*-gallate’dir (Santos-Buelga ve ark 1995).

1.3.6. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Antikanser Ajanı Olarak Etkileri

Proantosiyanidinlerin ve flavon-3-ollerin kimyasal maddelerin neden olduğu kanser oluşumunu; apoptozu düzenleyici, antioksidan ve antimutajenik aktivite gibi farklı mekanizmalar yoluyla önlediği gösterilmiştir (Cos ve ark 2004). Kanserojenik süreçlerin inhibisyonunun ötesinde proantosiyanidinlerin etki mekanizması için

birçok görüş ileri sürülmüştür, bunlardan öne çıkan antioksidan veya ROS/RNS kovucu aktivitelerdir (Bagchi ve ark 2002).

GSE bir besin takviyesi olarak son yıllarda pek çok kişi tarafından kullanılmaktadır. Bu ekstrenin sitotoksitesisi birçok kanser hücre kültürlerinde araştırılmıştır. 20 ve 50 mg/L GSE'nin MCF-7 meme kanseri, A-427 akciğer kanseri ve CRL-1739 gastrik adenokarsinoma hücreleri üzerine konsantrasyona ve zamana bağlı sitotoksik etki gösterdiği, neoplastik K562 myelögenöz lösemi hücrelerine karşı etkili olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, GSE sağlıklı insan gastrik mukoza hücrelerinin ve J774A.1 kemirgen makrofaj hücrelerinin yaşayabilirliğini ve büyümesini artırmıştır (Ye ve ark 1999). GSE uygulaması sağlıklı insan Chang karaciğer hücrelerinde idarubisin ve 4-hidroksiperoksisiklofosfamidin ile uygulanan kemoterapinin neden olduğu toksik etkileri azaltmıştır (Joshi ve ark 2000). SKH-1 tüysüz farelere üzüm çekirdeğinden ekstrakte edilen proantosiyanidinlerin verilmesi hem ultraviyole ışınlarının neden olduğu deri kanserini hem de malignite oluşumunu önlemiştir (Mittal ve ark 2003). Bu sonuçların aksine, GSE'nin fare ve sıçanlarda kimyasalların neden olduğu meme tümörlerini önlemede etkili olmadığını iddia eden çalışmalar da vardır (Singletary ve Meline 2001).

GSE'nin koruyucu özelliğinin DNA tamiri, lipid peroksidasyonu ve intrasellüler kalsiyum homeostazisi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bagchi ve ark 2002). İlave olarak, GSE'nin kimyasal maddelerin neden olduğu karaciğer ve böbrek toksitesisine karşı koruma sağladığı, karaciğer dokusunda bcl-xL ekspresyonunu artırdığı ve hem nekrotik hem de apoptotik karaciğer hücrelerinin ölümünü antagonize ettiği gösterilmiştir (Ray ve ark 1999). GSE'nin dumansız tütünün (Maraş otu) neden olduğu oksidatif hasara ve apoptosise karşı koruyucu etkisi insan oral keratinositlerden elde edilen birincil kültürde araştırılmıştır. 300 µg/ml dumansız tütün uygulanan hücrelere eklenen 75 µM E ve C vitamini kombinasyonu oral hücrelerdeki tütünün neden olduğu apoptozu % 46, 100 mg GSE/ml ~ % 85 azaltmıştır (Bagchi ve ark 1999a).

X ışınlarına maruz bırakılan sıçanlarda günlük 50 mg/kg GSE takviyesinin yükselen lenfosit MDA seviyelerini azalttığı ve GSH, retinol ve beta-karoten seviyelerini yükselttiği gösterilmiştir (Enginar ve ark 2007). Yetişkin erkek ICR

farelere 9 gün boyunca günlük 100 mg/kg GSE takviyesinin doksorubusunin neden olduğu kardiyotoksisiteyi önemli ölçüde azalttığı hem biyokimyasal hem de histopatolojik olarak gösterilmiştir (Ray ve ark 2000). Aromataz, androjeni östrojene çeviren bir enzimdir ve aromataz ekspresyonu meme kanseri olan dokularda sağlıklı dokulara göre artar. GSE'nin aromataz inhibitörü olduğu ve aromataz ekspresyonunu baskıladığı in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir (Kijima ve ark 2006).

1.3.7. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Antiinflamatuvar Ajan Olarak Etkileri

Flavonoidlerin antiinflamatuvar etki gösterdikleri ve immun fonksiyonları module ettikleri birçok çalışmada (Sen ve Bagchi 2001, Zhang ve ark 2006, Ma ve ark 2007) gösterilmiştir. Hücre adhezyonu, inflamasyonda ve immun fonksiyonlarda merkezi öneme sahiptir. İntersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) endotel hücrelerinde eksprese edilen ve hücre adhezyon sürecine katkıda bulunan glikoprotein yapısında maddelerdir. Proinflamatuvar sitokinler, serbest radikaller ve çeşitli kimyasalların hücre adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu ve fonksiyonunu aktive ettiği bilinmektedir (Sen ve Bagchi 2001). Üzüm çekirdeği ekstresinin insan umbilikal ven endotelinde TNF- α 'nın neden olduğu VCAM-1 ekspresyonunu azalttığı, ama ICAM-1 ekspresyonunu etkilemediği gösterilmiştir (Sen ve Bagchi 2001, Zhang ve ark 2006, Ma ve ark 2007). Kalfin ve ark (2002) sistemik skleroz hastalarında MDA seviyelerine ilaveten ICAM-1, VCAM-1 ve E selektin seviyelerinin yükseldiğini ve 30 gün boyunca 100 mg GSE takviyesinin MDA seviyeleri ile birlikte bu adhezyon moleküllerinin seviyelerini azalttığını göstermişlerdir.

Bu sonuçların aksine, yüksek kolesterol, sigara ve hipertansiyon gibi sebeplerle ortalamanın üzerinde kardiyovasküler riski olan bireylerde 12 hafta boyunca 1 g GSE ve 0,5 g quersetin takviyesinin ICAM-1 ve VCAM-1'i etkilemediği gösterilmiştir (Clifton 2004). Dişi BALB/c farelerde 10 gün boyunca doksorubisin ile birlikte günlük 10 mg/kg (i.p.) GSE takviyesinin tümör oluşumunu önemli ölçüde baskıladığı gösterilmiştir. Buradaki etki mekanizmasının lenfosit proliferasyonunun, NK hücre toksisitesinin, CD4+/CD8+ oranının ve IL-2 ve IFN- γ düzeylerinin artışı olduğu iddia edilmiştir (Zhang ve ark 2005). Karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçanlarda iskemi-reperfüzyon hasarından 15 gün

önce ve sonra oral olarak uygulanan 50 mg/kg GSE, iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında yükselen serum ALT, AST ve LDH düzeylerini ve TNF- α ve IL-1 β düzeylerini azaltmıştır (Şehirli ve ark 2008).

İki hafta boyunca diyetlerine % 0,2, % 0,5 ve % 1 GSE eklenen farelerde ultraviyole ışınlarının IL-10 ve IL-2 seviyelerinde neden olduğu artışın GSE takviyesi ile azaldığı gözlemiştir (Sharma ve Katiyar 2006). Karragen ile pençe ödemi, kroton yağı ile de kulak tümörü oluşturulan farelerde hasar oluşturulmadan 30 dakika önce 10, 20 ve 40 mg/kg GSE uygulaması sonucunda, 10 mg/kg GSE uygulanan grupta NO, TNF- α , IL-1 β ve PGE₂ düzeyleri azalmış ve bu azalma GSE’de bulunan proantosiyanidinlerin anti-inflamatuar etkinliğine bağlanmıştır (Li ve ark 2001). Deneysel olarak safra kesesi tıkanıklığı oluşturulan sıçanlarda, 28 gün 50 mg/kg oral GSE uygulamasının yükselen TNF- α düzeylerini normale yaklaştırdığı gösterilmiştir (Dulundu ve ark 2007).

1.3.8. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

Üzüm suyu ve GSE’nin kardiyovasküler hastalıklardaki etkileri üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır (Çizelge 1.4) (Kar ve ark 2006). Bu çalışmalarda GSE’nin yüksek kardiyovasküler riski olan bireylerde LDL oksidasyonunu (Miyagi ve ark 1997, Stein ve ark 1999, Bagchi ve ark 2003) ve trombosit agregasyonunu (Keevil ve ark 2000, Freedman ve ark 2001, Vitseva ve ark 2005) azalttığı, NO salınımını artırdığı (Demrow ve ark 1995) ve endotel fonksiyonlarını geliştirdiği (Geleijnse ve ark 2002) gösterilmiştir. GSE takviyesinden sonra akım aracılı vazodilatasyonun iyileştiği, GSE’nin bu etkisini NO salınımı artırarak gösterdiği bildirilmiştir (Clifton 2004).

10 hafta boyunca yüksek kolesterolle ve Hindistan cevizi yağı ile beslenen Altın Suriye hamsterları, hiperkolesterolemik insanlara benzer lipid profili gösterirler. Bu uygulama aort duvarı üzerinde köpük hücrelerinin oluşumuna neden olur, bu da aterosklerozun erken safhalarının biyobelirteci olarak kullanılır (aterosklerotik indeks).

Çizelge 1.4. Üzüm/üzüm çekirdeği kullanılarak yapılan çalışmalardan örnekler (Kar ve ark 2006).

Kullanılan Ürün	Çalışma sonucu	Kaynak
Üzüm suyu ve kırmızı şarap	Köpekte arter stenozunda in vivo trombosit aktivitesinin inhibisyonu ve tromboz	Demrow ve ark 1995
Üzüm suyu ve kırmızı şarap	İnsanlarda LDL oksidasyonunun azalması	Miyagi ve ark 1997
Üzüm çekirdeği ekstresi	C ve E vitaminine kıyasla daha güçlü oksijen-serbest radikallerini kovucu etki	Bagchi ve ark 1997
Üzüm çekirdeğinden elde edilen prosiyanidinden zengin ekstre	Tavşanlarda ateroskleroz gelişiminin azalması	Yamakoshi ve ark 1999
Kırmızı üzüm suyu	Endotel fonksiyonlarının gelişmesi, LDL oksidasyonuna hassasiyetin azalması	Stein ve ark 1999
Üzüm suyu	İnsanlarda trombosit agregasyonunun inhibisyonu	Keevil ve ark 2000
Kırmızı üzüm suyu	In vivo trombosit agregasyonu azalır, nitrik oksit salınımı artar	Freedman ve ark 2001
Üzüm çekirdeği ekstresi	Hiperkolesterolemik bireylerde plazma antioksidan kapasite ve lipid prolifi iyileşir	Vinson ve ark 2001a
Üzüm çekirdeği ekstresi	Sigara içenlerde post prandial oksidatif stres azalır, antioksidan seviyeleri yükselir	Natella ve ark 2002
Üzüm çekirdeği ekstresi	Okside LDL seviyeleri önemli ölçüde azalır, endotelial CD36 ekspresyonu inhibe olur	Bagchi ve ark 2003
Üzüm çekirdeği ekstresi	Akım aracılı dilatasyonun azaldığı ultrasonik olarak gösterilmiştir	Clifton 2004
Üzüm çekirdeği polifenolleri	Hipertansif sıçanlarda kan basıncı azalır	Peng ve ark 2005
Üzüm çekirdeği ekstresi	Yaşlı sıçanların merkezi sinir sisteminde antioksidan durumu gelişir, lipid peroksidasyonu azalır	Balu ve ark 2005a Balu ve ark 2005b
Üzüm çekirdeği ekstresi	Trombosit fonksiyonları ve reaktif oksijen ara ürünlerinin salınımı inhibe olur	Vitseva ve ark 2005

Hiperkolesterolemik hamster diyetine 50 veya 100 mg/kg GSE eklenmesi aterosklerotik indekste sırasıyla % 50 ve % 63 azalmaya neden olmuş, total plazma kolesterol düzeyleri sırasıyla % 25 ve % 23, trigliserit seviyeleri ise % 10 ve % 34 azalmıştır (Vinson ve ark 2001b). Bu çalışmaya ilave olarak, 10 hafta boyunca 50 ve 100 mg/kg GSE ve 50 mg/kg GSE ile birlikte 40 mg/kg niasin bağlı krom ile beslenen hiperkolesterolemik hamsterlarda plazma total kolesterol seviyelerinin sırasıyla % 25, 23 ve 42, trigliserit seviyelerinin sırasıyla % 10, 34 ve 77 azaldığı

gösterilmiştir (Vinson ve ark 2002). Tebib ve ark (1994) GSE ile beslenen sıçanlarda feçesle kolesterol atılımının kontrollere kıyasla 2 kat arttığını rapor ederek GSE'nin intestinal kolesterol absorpsiyonunu inhibe ettiğini ve azalttığını iddia etmişlerdir. Kolesterolle beslenen tavşanlarda 6 hafta boyunca diyetle % 0,1 ve % 1 oranında karıştırılan GSE'nin aortik ateroskleroz gelişimini ve LDL ve LDL/HDL oranını doza bağlı olarak azalttığı gösterilmiştir (Yamakoshi ve ark 1999). Hiperkolesterolemik hastalarda 8 hafta boyunca günlük 200 µg niasin bağlı krom ile birlikte 100 mg GSE takviyesinin kolesterol, LDL ve okside LDL antikör düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (Preuss ve ark 2000).

In vivo çalışmalarda (Diebolt ve ark 2001, Bernatova ve ark 2002, Peng ve ark 2005) kırmızı şaraptaki polifenollerin normo ve hipertansif sıçanlarda kan basıncını azalttığı gösterilmiştir. GSE'nin niasin bağlı krom ve çinko kombinasyonu ile birlikte yaklaşık 1 yıl süreyle diyetle karıştırılarak uygulanmasının sağlıklı sıçanlarda sistolik kan basıncını, insulin/glikoz oranını, HbA1C konsantrasyonunu ve karaciğer TBARS seviyelerini azalttığı, ancak lipid (total kolesterol, HDL, trigliserit), ürik asit ve kan üre nitrojeni (BUN) değerlerini etkilemediği gösterilmiştir (Preuss ve ark 2001).

GSE'nin miyokard iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi ad libitum beslenen erkek Sprague-Dawley sıçanlarda araştırılmıştır. 3 hafta boyunca 50 ve 100 mg/kg oral GSE verilen sıçanlarda MDA oluşumunun GSE verilmeyen sıçanlara kıyasla önemli ölçüde azaldığı, ayrıca GSE'nin kalp iskemisi sonucu oluşan hidroksil ve peroksil radikallerini kovmada etkili olduğu gösterilmiştir (Sato ve ark 1999). GSE ayrıca iskemi sonrasında uygulanan reperfüzyonun neden olduğu ventriküler fibrilasyonu ve ventriküler taşikardiyi önemli ölçüde azaltmıştır (Pataki ve ark 2002). GSE veya kırmızı şarap ile beslenen sıçanların kalplerinin iskemi/reperfüzyon hasarına karşı kontrol hayvanların kalplerine kıyasla daha dirençli olduğu gösterilmiştir (Sato ve ark 2002, Bagchi ve ark 2003). GSE takviyesi sonucunda kan akım parametreleri gelişmiş, enfarktüs büyüklüğü, hidroksil radikallerinin oluşumu ve MDA seviyeleri ise azalmıştır (Beecher 2004). GSE tavuklarda kardiyomiyosit apoptozunu önemli ölçüde azaltmış, proapoptotik faktör JNK ve c-Jun seviyelerini azaltmıştır. GSE'nin tavuk kardiyomiyositleri üzerine koruyucu etkisinin serbest radikal kovucu etkilerinin sonucu olduğu gösterilmiş ve

protein kinaz C veya nitrik oksit sentetaz aktivitelerinden bağımsız olduğu iddia edilmiştir (Shao ve ark 2003). 3 hafta boyunca GSE ile beslenen sıçanlarda iskemi/reperfüzyon hasarında kardiyak geri dönüşün geliştiği ve bununla birlikte elektron spin rezonans spektroskopisi ile ölçülen serbest radikal seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Pataki ve ark 2002).

Kırmızı şarap, GSE ve kakao gibi proantosiyanidin içeren besin maddelerinin LDL oksidasyonuna karşı koruma sağladığı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda bulunmuştur (Kromhout 2001, Aviram ve Fuhrman 2002). Kırmızı şarap veya kırmızı şarap polifenollerini kullanan gönüllülerden izole edilen LDL'lerin oksidasyona hassasiyetinin azaldığı gösterilmiştir (Fuhrman ve ark 1995, Nigdikar ve ark 1998). Böylece, polifenoller LDL oksidasyonunu ve sonuçta ateroskleroza önleyebilir (Halliwell 1999). Prosiyanidinlerin veya proantosiyanidinden zengin birçok ürünün izole LDL partiküllerinde oksidasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Lotito ve ark 2000, Reed ve ark 2002). Klinik çalışmalar (Natella ve ark 2002) GSE tüketiminin bir kardiyovasküler hastalık belirteci olan okside LDL'yi ve postprandial safhada plazma lipid hidroperoksitlerini azalttığını göstermiştir. İlginç olarak, bakır iyonlarının aracılık ettiği LDL + VLDL oksidasyonunun *in vitro* modelinde GSE'nin E ve C vitamini ile sinerjik etki gösterdiği bildirilmiştir (Peng ve ark 2005). Bu sonuçların aksine, yüksek kolesterol, sigara ve hipertansiyon gibi sebeplerle ortalamanın üzerinde kardiyovasküler riski olan bireylerde 12 hafta boyunca 1 g GSE ve 0,5 g quersetin takviyesinin kan basıncı, diğer kardiyovasküler parametreler, serum lipidleri ve CRP seviyeleri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı iddia edilmiştir. Bu uygulama idrar 8-isoPGF2 α düzeylerini de etkilememiştir (Clifton 2004).

Kakao prosiyanidin trimer ve pentamerlerine ilave olarak alkolü alınmış kırmızı şarabın stimüle edilmemiş trombositlerde trombosit aktivasyon belirteçlerinin (P-selektin) ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Rein ve ark 2000). Kırmızı üzüm suyu, üzüm çekirdeği ve kabuğunun birlikte ekstresi gibi besin kaynakları köpek, maymun ve insanlara verildiği zaman trombosit agregasyonunu inhibe eder (Reed ve ark 2002, Shanmuganayagam ve ark 2002). Düşük molekül ağırlıklı proantosiyanidinlerin ve epikateşinlerin insan 5-lipooksijenazın güçlü bir inhibitörü olduğu (Schewe ve ark 2002) ve kakaodan elde edilen proantosiyanidin trombosit

fonksiyonlarını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Murphy ve ark 2003). Sıçanlarda alkol içeren ve içermeyen kırmızı şarabın kanama zamanını uzattığı ve trombus ağırlığını azalttığı ortaya konulmuştur (Wollny ve ark 1999). Postmenopozal kadınlarda 8 hafta boyunca 400 mg/gün GSE takviyesinin trombosit fonksiyonları üzerine yararlı etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Shenoy ve ark 2007).

Kırmızı şaraptan izole edilen proantosiyanidin fraksiyonlarının karakterizasyonu sonucunda düşük moleküler ağırlıklı oligomerlerin vazodilatör aktivitesinin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Kırmızı üzüm suyu kullanan ve koroner arter hastalığı olan bireylerde brakial arter vazodilatasyonu proantosiyanidin kullanmayanlara göre fazladır (Beecher 2004). Şarap ve üzüm suyunun nitrik oksit üretimini artırarak kan damarlarında endotele bağlı vazorelaksasyonun artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Fitzpatrick ve ark 2000). Ayrıca, birçok proantosiyanidin preparatının anjiyotensin dönüştürücü enzim aktivitesini inhibe ettiği hem in vivo hem de in vitro deneylerde gösterilmiştir (Beecher 2004). GSE takviyesinin sıçanlarda puromisin-aminonükleozid nefrozda idrarla protein atılımını ve serum kolesterol ve trigliserit seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Mattoo ve Kovacevic 2003).

Özet olarak bu sonuçlar GSE'nin biyoyararlanımının bulunduğunu, güçlü bir serbest radikal kovucu olduğunu ve kardiyoprotektif etkilerinin bulunduğunu göstermektedir. GSE bu kardiyoprotektif etkisini:

1. Hidroksil ve diğer serbest radikalleri güçlü kovucu etkisi ile,
2. Anti-apoptotik, anti-nekrotik, anti-endonükleotik potansiyeli ile,
3. Apoptotik düzenleyici bcl-XL, p53, c-myc genleri üzerine olan modülatör etkileri ile,
4. Sitokrom P450 2E1 inhibitör aktivitesi ile,
5. Adhezyon molekülleri üzerine inhibitör etkileri ile,
6. Proapoptotik ve kardiyoregülatör genler olan c-JUN, JNK-1 ve CD 36 üzerine modülatör etkileri ile gösterir.

1.3.9. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Antioksidan Aktivitesi

Küçük molekülü proantosiyanidinler antioksidan salınımını kontrol eder ve diğer suda çözünen antioksidanlardan mekanik açıdan farklı olarak plazma ve dokularda 7-10 gün arasında kalıp antioksidan özelliklerini gösterirler (Bagchi ve ark 2000). Aksine yüksek moleküler ağırlıklı polimerik ekstrakte olmayan proantosiyanidinler peroksil radikallerinin çok güçlü kovucusudur, ama bunlar tamamen absorbe olmazlar ve biyoyararlanımları çok fazla değildir. Bununla birlikte, bu yüksek moleküler ağırlıklı proantosiyanidinler antioksidan aktivitelerini sindirim kanalında gösterirler ve lipidleri, proteinleri ve karbonhidratları sindirim esnasında oksidatif hasardan korur (Hagerman ve ark 1998). Antioksidan aktivitede 5 temel mekanizma tanımlanmıştır: (1) serbest radikal kovucu aktivite, (2) geçiş metallerinin yakalanması, (3) enzimlerin inhibisyonu, (4) enzim-mimerik aktivite ve (5) singlet oksijenin bastırılması. Bunlardan ilk üç mekanizmaya proantosiyanidinler de katılır (Cos ve ark 2004). Proantosiyanidinler ve metabolizma ürünleri yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu aktiviteye temel katkıyı B halkası üzerindeki katekol grupları ve indirgenme ürünlerinin stabilitesi ve quinonlar sağlar (Beecher 2004).

Bir antioksidanın serbest radikal kovucu aktivitesinin temel mekanizması, serbest radikal türlerine bir elektron vererek redoks geçişini sağlamasıdır. GSE'nin yüksek serbest radikal kovucu etkisi nispeten yüksek konsantrasyonda prosiyanidin içeriği ile ilişkilidir (Cos ve ark 2004). Elektron spin rezonans tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada (Bors ve ark 2000) proantosiyanidinlerin çok güçlü antioksidan aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir. GSE'nin yüksek antioksidan aktivitesinin çekirdek ekstresindeki yüksek fenolik içerik ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Baydar ve 2007).

Proantosiyanidinlerin metal yakalayıcı etkisi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır. Bir çalışmada (Cos ve ark 2004), proantosiyanidinlerin metalleri yakalayıcı etkisinde B-halkasının rolü olduğu iddia edilmiştir. Proantosiyanidinler prooksidatif enzimlerin inhibisyonu vasıtasıyla da antioksidan aktivite gösterebilirler. Araştırmalar bu süreçte lipooksijenazın inhibisyonuna odaklanmıştır (Schewe ve ark 2001).

Çok sayıdaki epidemiyolojik çalışmada (Renaud ve de Lorgeil 1992) yüksek antioksidan durumunun düşük dejeneratif hastalık riskiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Taze meyve ve yeşil sebze tüketiminin artması insan vücudunda antioksidan durumunu geliştirir. Diğer taraftan sigara içimi ve fiziksel stres gibi etkenler serbest radikal üretimini artırarak dejeneratif hastalıklara yol açabilir. Bütün bunlar birarada ele alındığında, araştırmalar GSE'nin biyoyararlanımının fazla olduğunu ve çeşitli kimyasalların, çevresel faktörlerin ve ilaçların neden olduğu hedef organ toksisitesine karşı koruyucu rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu yeni antioksidanın yararlı etkilerini ortaya koymak için deneysel ve klinik çalışmalar devam etmektedir (Bagchi ve ark 2002). Proantosiyandinler özellikle sulu sistemlerde çok güçlü antioksidan aktivite gösterirler (Ariga 2004).

GSE, E vitamini ve C vitamininin süperoksit anyonu ve hidroksil radikaline karşı etkileri in vitro olarak sitokrom c redüksiyonu ve kemilüminesan cevap yoluyla değişik konsantrasyonlarda değerlendirilmiştir. Süperoksit anyonu ve hidroksil radikaline 50 mg/L GSE'nin E vitaminine kıyasla sırasıyla % 84 ve % 98, 100 mg/L GSE'nin C vitaminine kıyasla sırasıyla % 439 ve % 575 daha fazla serbest radikal kovucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Bagchi ve ark 1997). Bir diğer çalışmada (Sato ve ark 1999) ise GSE'nin süperior peroksil radikalini kovma yeteneğinin troloksa kıyasla daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. Bu sonuçların aksine son zamanlarda yapılan bir çalışmada (Morin ve ark 2008), 47 gün boyunca A ve E vitamininden eksik veya zengin diyetle, 0,04 veya 0,4 mg/g GSE ile beslenen sıçanlarda lökosit 8-oxodG seviyelerinin A ve E vitamini takviyesi ile sırasıyla % 63 ve % 65 azaldığı, düşük ve yüksek GSE takviyesi ile sırasıyla % 27 ve % 20 azaldığı gösterilmiştir. Miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçanlarda 3 hafta boyunca 100 mg/kg GSE takviyesi kalp dokusundaki MDA seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır, böylece GSE'nin güçlü in vivo serbest radikal kovucu etkisi ile kalbin korunmasına katkı sağlayabileceği ileri sürülmüştür (Sato ve ark 1999). Baghci ve arkadaşları (1999b) stresin neden olduğu ROS üretimindeki artışa bağlı olarak oksidatif gastrointestinal hasara karşı GSE'nin önemli ölçüde koruyucu rol oynadığını göstermişlerdir. GSE'nin kronik pankreatit semptomlarının kontrolünde etkin olduğu ve bu hastalarda hem ağrı indeksini hem de kusma sıklığını azalttığı gösterilmiştir (Banerjee ve ark 2001). Koga ve ark (1999) sıçanlarda 16-18 saat açlıktan sonra verilen tek doz 250 mg/kg GSE'nin plazmada antioksidan savunmayı

artırdığını göstermişlerdir. Bu sonuçların aksine, 10 hafta boyunca 50 ve 100 mg/kg GSE ve 50 mg/kg GSE ile birlikte 40 mg/kg niasin bağlı krom ile beslenen hiperkolesterolemik hamsterlarda GSE takviyesi ile plazma TBARS seviyelerinde herhangi bir değişiklik olmazken, 50 mg/kg GSE ile birlikte 40 mg/kg niasin bağlı krom ile beslenen hamsterlarda TBARS düzeyleri % 77 azalmıştır (Vinson ve ark 2002).

Farelerde yapılan bir in vivo çalışmada (Bagchi ve ark 1998a), 20, 50 ve 100 mg/kg GSE uygulamasının peritoneal makrofaj hücrelerinde, beyin ve karaciğer dokularında 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)'nın neden olduğu lipid peroksidasyonunda ve DNA fragmentasyonunda doza bağlı olarak önemli ölçüde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, GSE'nin hedef organlarda biyoyararlanımının olduğunu ve ROS ve serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu ve DNA hasarına karşı E ve C vitamini ve beta-karotene kıyasla önemli ölçüde daha fazla koruma sağladığını göstermektedir. Peritoneal makrofajlar tarafından ROS üretiminin TPA uygulanan ve öncesinde GSE verilen farelerde önemli ölçüde azaldığı, sitokrom c redüksiyonunun ve kemilüminesan cevabının azalması ile gösterilmiştir (Bagchi ve ark 1998a). Bütün bu biyolojik belirteçlerin cevabı doza bağlıdır ve aynı konsantrasyonda E veya C vitamini veya beta-karotenle beslenenlerde oluşan cevaplardan daha büyüktür (Beecher 2004).

Farelerde 7 gün boyunca günlük 100 mg/kg GSE'nin asetaminofenin neden olduğu ölümleri, karaciğer toksitesini, hepatik DNA hasarını, ALT aktivitesini, apoptotik hücre ölümünü önemli ölçüde azaltırken gen ekspresyonunu pozitif yönde etkilediği gösterilmiştir (Ray ve ark 1999). Aynı zamanda asetaminofenin neden olduğu toksititeye karşı renal fonksiyonları koruduğu gösterilmiştir (Ray ve ark 1999). GSE'nin amiodaronun neden olduğu akciğer hasarını ve doksorubisinin yol açtığı kalp ve karaciğer hasarını azalttığı farelerde gösterilmiştir (Ray ve ark 2000, Bagchi ve ark 2001).

GSE kemoterapotik ilaçların neden olduğu sitotoksititeye karşı sağlıklı insan karaciğerinde apoptotik düzenleyici genler olan bcl-2, c-myc ve p53'ü düzenlemek suretiyle ve ilaç ve kimyasalların neden olduğu multiorgan toksisitesine karşı da önemli koruma sağlar (Joshi ve ark 2001). GSE'nin kültüre edilmiş makrofaj

J774A.1 hücrelerinde ve nöroaktif PC-12 adrenal feokromositoma hücrelerinde H₂O₂'nin neden olduğu oksidatif hasara karşı doza bağlı olarak önemli ölçüde koruma sağladığı gösterilmiştir (Bagchi ve ark 1998b). Ayrıca uygulama öncesinde 7 gün ve sonrasında 14 gün boyunca 150 mg/gün GSE ile beslenen albino farelerde gentamisin'in neden olduğu böbrek hasarının ve kemik iliğindeki kromozomların korunduğu gösterilmiştir (El-Ashmavy ve ark 2006). Farelerde cyfluthrin uygulaması sonucunda meydana gelen oksidatif stres üzerine E vitamini, proantosiyandin ve N-asetilsisteinin etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada (Erarslan ve ark 2007) bu maddelerden 9 gün boyunca 100 mg/kg dozda verilmiş, tüm gruplarda MDA seviyeleri azalırken SOD ve CAT seviyeleri yükselmiş, ancak gruplar arasında herhangi bir fark bulunmamıştır. Sıçanlara 4 hafta süre ile 100 mg/kg GSE uygulamasının karaciğer mikrozomlarında anilin hidroksilasyonunu inhibe ederek hücre koruyucu etki gösterdiği iddia edilmiştir (Ray ve ark 2001a).

Üzüm çekirdeğinden elde edilen prosiyanidinlerin kullanımının diyabetik sıçanlarda anti-hiperglisemik etki gösterdiği gösterilmiştir. Streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda veya insüline hassas hücre kültürlerinde GSE uygulaması sonucunda GSE'nin insulinin etkisini taklit ettiği ve/veya insulinin sinyal iletim yollarının özgün komponentleri üzerine direkt etkisinin olduğu iddia edilmiştir (Pinent ve ark 2004). Alloksan ile tip 1 diyabet oluşturulan sıçanlarda, alloksan enjeksiyonundan 1 saat önce, 24, 48 ve 72 saat sonra 50 veya 100 mg/kg oral GSE uygulamasının serum insulin seviyelerini alloksan uygulamasından 72 saat sonra yükselttiği, serum glikoz seviyelerini ise doza bağlı olarak azalttığı iddia edilmiştir. GSE uygulamasının pankreas dokusunda yükselen MDA ve nitrit/nitrat düzeylerini sırasıyla 48 ve 48/72 saat sonra azalttığı, pankreatik GSH seviyelerini ise 48/72 saat sonra yükselttiği gösterilmiştir (El-Alfy ve ark 2005). Bir hücre kültürü çalışmasında (Fujii ve ark 2006) GSE'nin yüksek glikozun neden olduğu oksidatif strese karşı koruma sağladığı, bunun yanında artan siklooksijenaz-2 ve iNOS seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. GSE'nin CAT ve GST seviyelerini artırarak ve MDA üretimini azaltarak ROS'un neden olduğu oksidatif lenfosit hasarını önlediği gösterilmiştir (Stankovic ve ark 2008). Deneysel olarak diyabet oluşturulan sıçanlarda astrosit proliferasyonunun arttığı, 250 mg/kg GSE takviyesinin bunu inhibe ettiği, ayrıca GSE'nin diabetik hippokampal dejeneratif değişiklikler üzerine antagonist etkisinin olduğu gösterilmiştir. GSE'nin buradaki etkisini muhtemelen

RAGE (ileri glikasyon son ürünleri reseptörleri) yoluyla ve bunun devamında olan mediatörler aracılığıyla gösterdiği iddia edilmiştir (Xu ve ark 2008).

Sıçanlarda isoproterenol ile oluşturulan miyokard hasarı üzerine GSE'nin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Karthikeyan ve ark 2007), 5 hafta boyunca haftada 6 gün 50, 100 ve 150 mg/kg oral GSE uygulaması yükselen serum AST, ALT, LDH, CK ve miyokard TBARS seviyelerini doza bağlı olarak azaltıp normale yaklaştırmış, miyokardiyal GSH, GPx, GST ve SOD seviyelerini ise doza bağlı olarak yükseltmiştir.

Proantosiyanidinden zengin ekstrenin iskemi-reperfüzyon uygulamasında oksidatif stresin sebep olduğu böbrek hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Nakagawa ve ark 2005). Üzüm proantosiyanidinlerinin güneş yanıklarına karşı koruyucu etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Bagchi ve ark 2000).

Kardiyomiyositlere GSE (25 µg/ml), baisalın (25 µM) ve wogonin (25 µM) iskemi-reperfüzyon hasarından hemen önce veya 72 saat önce uygulandığında GSE'nin hem akut hem de kronik uygulama ile hücre ölümünde önemli azalma sağladığı görülmüştür (Chang ve ark 2006). Proantosiyanidinlerin anti-ülser etkisi sıçanlarda araştırıldığında, polimerizasyon derecesinin artması ile proantosiyanidin aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Saito ve ark 1998). GSE'den elde edilen proantosiyanidinlerin farelerin kıl folikülü hücrelerinin büyümesini artırdığı ortaya konulmuştur (Rapport ve ark 2001).

Yedi günlük sıçan yavrularında hipoksi oluşturulmadan 5 dakika önce, oluşturulduktan 4, 18 ve 26 saat sonra i.p. olarak verilen 50 mg/kg GSE'nin hipoksinin neden olduğu iskemik beyin hasarını ve beyin dokusunda lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Feng ve ark 2005). Aynı çalışma grubu tarafından yapılan bir diğer çalışmada (Feng ve ark 2007) ise benzer şekilde yedi günlük sıçan yavrularında hipoksi oluşturulduktan 3 saat sonra i.p. olarak verilen 50 mg/kg GSE'nin hipoksinin neden olduğu iskemik beyin hasarını ve beyin dokusunda 8-isoPGF_{2α} düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Genç ve yaşlı sıçanlara 30 gün boyunca günlük 100 mg/kg oral GSE uygulaması, yaşlı sıçanlarda omurilik, serebral korteks, striatum ve hippokampus bölgelerinde yükselen protein karbonil, lipid

peroksidasyonu ve DNA hasarını GSE almayan yaşlı sıçanlara kıyasla önemli ölçüde azaltırken, azalan enzimatik (SOD, GPx ve CAT) ve non-enzimatik (GSH, E ve C vitamini) antioksidanlar GSE almayan yaşlı sıçanlara kıyasla önemli ölçüde yükselmiştir (Balu ve ark 2005a, Balu ve ark 2005b, Balu ve ark 2006). Devi ve ark (2006) erkek albino Wistar sıçanlara 9 hafta boyunca oral olarak 25, 50 ve 75 mg/kg GSE uygulamış ve 25 ve 50 mg/kg GSE uygulanan gruplarda beyin dokusundaki lipid peroksidasyonunda ve SOD aktivitesinde sınırlı bir değişim gözlemlemişlerdir. 75 mg/kg GSE beyin dokusundaki MDA seviyelerini % 70 azaltırken, SOD aktivitesi de % 70 oranında artmış, CAT seviyelerinde ise herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Devi ve ark 2006). Karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçanlarda iskemi/reperfüzyon hasarından 15 gün önce ve sonra oral olarak uygulanan 50 mg/kg GSE iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında yükselen karaciğer MDA düzeylerini azaltırken, azalan karaciğer GSH düzeylerini yükseltmiştir (Şehirli ve ark 2008). GSE’de bulunan polifenollerin fare dalağında oksidatif stresin neden olduğu hücre DNA hasarı üzerine yararlı etkiler gösterdiği ortaya konulmuştur (Fan ve Lou 2004).

DeneySEL olarak safra kesesi tıkanıklığı oluşturulan sıçanlarda 28 gün 50 mg/kg oral GSE uygulamasının azalan plazma antioksidan kapasitesini ve karaciğer GSH seviyelerini yükselttiği, artan karaciğer MDA ve MPO aktivitelerini ise azalttığı gösterilmiştir (Dulundu ve ark 2007). Gastrik mukoza hasarı oluşturulan sıçanlarda 2 hafta boyunca içme suyuna % 0,002, % 0,02 % 0,2 veya % 1 oranında karıştırılarak ad libitum verilen GSE’nin gastrik mukoza hasarını ve MPO aktivitelerini önemli ölçüde baskıladığı, SOD aktivitesini ise uyardığı gösterilmiştir. GSE takviyesi doza bağlı olarak gastrin, somatostatin ve histamin seviyelerini önemli ölçüde baskılarken PGE₂ sekresyonunu artırmıştır (Iwasaki ve ark 2004).

GSE uygulamasının glial hücrelerde iNOS’u aktive ederek nitrik oksit üretimini artırdığı, GSH seviyelerini yükselttiği gösterilmiştir. Ayrıca GSE ile ön uygulama yapılan hücrelerin H₂O₂’ye karşı daha toleranslı oldukları ve sonuçta GSE’nin sıçan glial kültüründeki hücre koruyucu etkisini GSH’yı koruma yoluyla gösterdiği iddia edilmiştir (Roychowdhury ve ark 2001).

İnsanlarda 30 gün boyunca 110 mg GSE takviyesinin plazma α -tokoferol seviyelerini etkilemediği, eritrosit α -tokoferol seviyelerini ve plazma antioksidan

potansiyelini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca GSE takviyesi lenfosit okside DNA (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine/2'-deoksiguanozin oranı) düzeylerini de azaltmıştır (Simonetti ve ark 2002).

1.3.10. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Yan Etkileri ve Güvenilirliği

Bugüne kadar yapılan in vivo çalışmalarda GSE'nin herhangi bir yan etkisi bildirilmemiştir. GSE uzun yıllardan beri Amerika ve Avrupa'da kullanılan bir besin takviyesidir ve FDA tarafından GRAS (Genel olarak güvenli kabul edilen) statüsüne konulmuştur. Tavsiye edilen GSE dozu günlük 100 ila 300 mg arasında değişmektedir. Hamilelerin ve emziren annelerin GSE kullanmaması önerilmektedir (Kar ve ark 2006).

GSE için yapılan doz çalışmalarında erkek ve dişi albino sıçanlarda gastrik entübasyon yoluyla verilen GSE'nin LD50 değerinin 5000 mg/kg'dan fazla olduğu gösterilmiştir (Ray ve ark 2001b). Tavşanlarda 0,5 g GSE deri altı enjeksiyonla verilmiş ve 85 mg GSE göze damlatılmış ve derideki irritasyonun birincil irritasyon indeksinin 2,7 ile orta derecede olduğu, gözde meydana gelen irritasyonun ise 14 günde tamamen kalktığı gözlenmiştir (Bagchi ve ark 2000). Deri tahrişi açısından GSE orta dereceli irritasyon yapıcı olarak sınıflandırılmıştır ve dişi ve erkek albino sıçanlarda 2 g/kg dozda sistemik toksik etkisi olmamıştır (Ray ve ark 2001b).

Uzun süreli (90 gün) toksikolojik çalışmalarda (Yamakoshi ve ark 2002) erkek sıçanlarda 1,4 g/kg, dişi sıçanlarda ise 1,5 g/kg oral GSE takviyesi herhangi bir yan etkiye sebep olmamıştır. 90 gün boyunca dişi ve erkek sıçanlara diyetin % 0,5, % 1 ve % 2 oranında karıştırılan GSE'nin vücut ağırlığı, besin tüketimi, hematolojik parametreler, organ ağırlığı veya histopatolojisi üzerine herhangi bir yan etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Wren ve ark 2002). Vogels ve ark (2004) GSE'nin psikolojik durumu etkilemeksizin normal ve kilolu bireylerde besin alımını azalttığını göstermiştir. Sıçanlarda 3 ay süre ile diyetin daha yüksek dozda (% 1,25 veya % 2,5) eklenen GSE'nin histolojik ve toksikolojik parametreler üzerine herhangi bir yan etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Bentivegna ve Whitney 2002). Bir yıl boyunca erkek B6C3F1 farelere günlük 100 mg/kg veya 6 ay boyunca dişi farelere 500 mg/kg GSE takviyesi sonucunda hayati organların histolojisinde ve serum biyokimyasında

gözlenen bir yan etki olmamıştır (Ray ve ark 2001b). Bu sonuçların aksine, tavuk embriyolarından izole edilen kardiyomiyositlerde, yüksek dozda GSE'nin nitrik oksit üretimini, aşırı NO üretiminin de apoptotik hücre ölümünü artırdığı iddia edilmiştir (Shao ve ark 2006).

Bu tez çalışmasının amacı, akut ve kronik egzersiz yaptırılan sıçanlarda üzüm çekirdeği ekstresi takviyesinin vücut ağırlığı, egzersiz performansı ve çeşitli oksidatif stres ve antioksidan savunma belirteçleri üzerine etkilerini araştırmaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deneysel Hayvanları Etik Kurulunun 25/07/2007 tarih ve 2007/23 sayılı kararı ile Etik Kurul onayı alındıktan sonra aynı merkezde gerçekleştirildi.

2.1. Hayvan Materyali ve Gruplar

Bu çalışmada, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen, çalışmanın başlangıcında ağırlıkları ortalama $243,4 \pm 29,2$ g ve yaklaşık 14 haftalık olan 64 erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı.

Deneysel grupları sıçanlar rasgele seçilmek suretiyle aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

Grup 1. Genel Kontrol Grubu (C) (n=10): Çalışma süresince herhangi bir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu.

Grup 2. Kontrol Kronik Egzersiz Grubu (CCE) (n=11): 6 hafta boyunca, haftada 5 gün, günde 45 dakika 25 m/dk hızda koşu bandında egzersiz yaptırılan grup.

Grup 3. Kontrol Akut Egzersiz Grubu (CAE) (n=11): Bir defaya mahsus olmak üzere koşu bandında 30 m/dk hızda tükeninceye kadar egzersiz yaptırılan grup.

Grup 4. GSE Kontrol Grubu (GC) (n=10): 6 hafta boyunca içme suyuna karıştırılmak suretiyle günlük 100 mg/kg GSE verilen ve başka herhangi bir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu.

Grup 5. GSE Kronik Egzersiz Grubu (GCE) (n=11): 6 hafta boyunca içme suyuna karıştırılmak suretiyle günlük 100 mg/kg GSE verilen ve bu süre boyunca, haftada 5 gün, günde 45 dakika 25 m/dk hızda koşu bandında egzersiz yaptırılan grup.

Grup 6. GSE Akut Egzersiz Grubu (GAE) (n=11): 6 hafta boyunca içme suyuna karıştırılmak suretiyle günlük 100 mg/kg GSE verilen ve bir defaya mahsus olmak üzere koşu bandında 30 m/dk hızda tükeninceye kadar egzersiz yaptırılan grup.

2.2. Deney Hayvanlarının Bakımı ve Beslenmesi

Çalışma süresince sıçanlar ortam sıcaklığı 21 ± 2 °C olan, % 50 nem içeren, 12 saat karanlık/aydınlık siklusu bulunan ve ortam havasının saatte 15 defa değiştiği iklim kontrollü odalarda tutuldular.

Deney hayvanları özel olarak imal edilmiş polikarbonat (Tecniplast, USA) kafeslerde beslendi. Sıçanların kafesleri haftada iki defa değiştirildi ve kirli kafesler dezenfeksiyon yöntemiyle temizlendi.

Kontrol gruplarındaki sıçanlar (C, CCE, CAE) taban alanı 1820 cm^2 olan kafeslerde her kafeste 5 hayvan olacak şekilde tutuldu. GSE gruplarındaki sıçanlar ise (GC, GCE ve GAE grupları) günlük GSE alımının doğru ve kontrollü olabilmesi için her kafeste 1 hayvan olacak şekilde tutuldu.

Sıçanlara yem ve su *ad libitum* olarak verildi. Hayvan yemleri, standart sıçan yemi olarak Optima Besin Maddeleri Sanayi Fabrikasında (Balıkesir) hazırlandı (Çizelge 2.1). Su olarak standart musluk suyu verildi. Sıçanların vücut ağırlıkları çalışmanın başlangıcında ve sonraki 6 hafta boyunca her hafta aynı gün ölçülerek kaydedildi.

2.3. Üzüm Çekirdeği Ekstresi Takviyesi

Grup 4, 5 ve 6'da bulunan sıçanlara (GC, GCE ve GAE grupları) 6 hafta boyunca içme suyuna karıştırılmak suretiyle günlük 100 mg/kg GSE verildi. Sıçanların vücut ağırlıklarının 100 gramı başına günlük yaklaşık 10-12 ml su tükettikleri bilindiğinden (Sharp ve La Regina 1998), GSE hayvanların günlük tüketebileceklerinden daha az miktarda su içerisinde çözüldü ve sıçanların öncelikle GSE almaları sağlandı, takiben suluklar tamamen doldurularak sıçanlara su *ad libitum* olarak verildi ve bu işlem 6 hafta boyunca her gün tekrarlandı. Ayrıca sıçanların günlük almaları gereken GSE miktarı haftalık vücut ağırlığı değişimlerine göre her hafta yeniden hesaplandı.

Çizelge 2.1. Standart sıçan diyetinin bileşimi.

Kuru Madde (%)	88,00
Ham Protein (%)	23,00
Ham Selüloz (%)	5,00
Ham Kül (%)	8,00
Metabolik Enerji (Kcal/kg)	3100
Kalsiyum (%)	1-1,3
Sodyum (%)	0,5-0,6
Fosfor (%)	0,9
Lizin (%)	0,35
Metiyonin (%)	0,45
Sistin (%)	0,35
A vitamini (IU/kg)	15.000
D ₃ vitamini (IU/kg)	3.300
E vitamini (mg/kg)	40

IH636 Üzüm Çekirdeği Ekstresi, ActiVin markası adı altında San Joaquin Valley Concentrates'den (CA, ABD) Phil Castro tarafından hediye edildi. IH636 üzüm çekirdeği ekstresi, Kaliforniya kırmızı üzüm çekirdeğinden standardize edilmiş su-etanol karışımıyla ekstrakte edilmiştir. HPLC ile birlikte yapılan gaz kromatografisi kütle spektrometresi analizlerine göre IH636 (GSE) % 54 dimerik proantosiyanidin, % 13 trimerik proantosiyanidin, % 7 tetramerik proantosiyanidin ve % 5'den az monomerik proantosiyanidin ve diğer flavonoidleri içerir. Bu ekstrede kateşin ve oligomerik proantosiyanidin gibi antioksidanlar da bulunmaktadır. ActiVin aynı zamanda % 10,8 polisakkarit, % 2,1 protein % 0,5 fitosterol, % 2,8 yağ asitleri ve % 5-6 su içerir (Joshi ve ark 2000, Sen ve Bagchi 2001, Kalfin ve ark 2002). GSE'ye ait detaylı analiz raporu Şekil 2.1'de verilmiştir.



SAN JOAQUIN VALLEY CONCENTRATES
Providing World-Class, Natural Products To Improve People's Lives

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Name of the Product	ActiVin Grape Seed Extract
Lot Number	0721
Type of Material	Grape Seed Extract
Chemical Classification	Organic, Nutritive
Physical Classification	Powder, Non-Fibrous
Plant Part	Unbroken Grape Seed (<i>Vitis vinifera</i>)
Extraction Solvent	Water
Date of Manufacture	April 24, 2007
Country of Origin	U.S.A

Analytical Results

Identification	Passes
Total Phenolic Content*	95.8%
Loss on Drying	6.3%
Solubility	Conforms
pH (1% Solution)	5.3
Bulk Density	Conforms
Tap Density	Conforms
ORAC Value (μ moleTE/g)	Conforms

Analytical Results

Passes	Conforms
95.8%	Conforms
6.3%	Conforms
Conforms	Conforms
5.3	Conforms
Conforms	Conforms
Conforms	Conforms
Conforms	Conforms

Specifications

To Pass Test	10,000 -12,500
>80.0% (as GAE)	
<8.0%	
>99.0% (GSE Method)	
3.0 to 6.0	
0.20 to 0.35 g/cc	
0.30 to 0.50 g/cc	
10,000 -12,500	

Metals Analysis

Arsenic (As)	<5 ppm
Cadmium (Cd)	<1 ppm
Lead (Pb)	<0.5 ppm
Mercury (Hg)	<0.2 ppm

<5 ppm	<0.2 ppm
<1 ppm	<0.2 ppm
<0.5 ppm	<0.2 ppm
<0.2 ppm	<0.2 ppm

<5 ppm	<0.2 ppm
<1 ppm	<0.2 ppm
<0.5 ppm	<0.2 ppm
<0.2 ppm	<0.2 ppm

Particle Size Distribution

Wt. % Retained on 200 Mesh	Conforms
----------------------------	----------

Conforms

<2%

Microbiological Assays

Total Plate Count (Cfu/gm)	<10
Yeast (Cfu/gm)	<10
Mold (Cfu/gm)	<2
E. Coli (Cfu/gm)	Not Detected
Staph. Aureus	Not Detected
Salmonella (Cfu/gm)	Not Detected

<10	Not Detected
<10	Not Detected
<2	Not Detected
Not Detected	Not Detected
Not Detected	Not Detected
Not Detected	Not Detected

<100	<3	<3	Not Detected (25 grams)
<10	<3	<3	
<2	<3	<3	
<3	<3	<3	
<3	<3	<3	
Not Detected (25 grams)			

*Results reported on a dry weight basis

Shelf Life: 2 years when stored in original containers in a cool, dry location with all liners sealed.

Confirmation that specification data from laboratory is accurately disclosed on this Certificate of Analysis:

San Joaquin Valley Concentrates

By: 

Date: May 3, 2007

SAN JOAQUIN VALLEY CONCENTRATES, 5631 E. OLIVE AVE., FRESNO, CA 93727-2708
TOLL FREE: 1-800-557-0220 PHONE: (559) 458-2500 FAX: (559) 458-2564

Şekil 2.1. Activin Üzüm Çekirdeği Ekstresine ait analiz sonuçları.

2.4. Egzersiz Protokolleri

Uygulanan tüm egzersiz protokollerinde sıçanlar için özel olarak tasarlanmış 6 kulvarlı kemirici koşu bandı kullanılmıştır (MAY-TME 0804 Animal Treadmill, Commat, Türkiye). Egzersiz çalışmaları esnasında koşu bandının fanı açılmış,

böylece koşu bandında hava sirkülasyonu sağlanmıştır. Ayrıca egzersiz aralarında koşu bandının kayışı idrar ve dışkı artıklarından temizlenmiştir.

2.4.1. Kronik Egzersiz Protokolü

Kronik egzersiz gruplarındaki hayvanlara 1 haftalık alıştırma periyodunun ardından 6 hafta boyunca haftada 5 gün, 25 m/dk (1,5 km/saat) hızda 45 dakika koşu bandında egzersiz yaptırıldı. Alıştırma protokolü aşağıdaki süre ve şiddetlerde gerçekleştirildi:

1. gün: 10 m/dk, 10 dk
2. gün: 20 m/dk, 10 dk
3. gün: 25 m/dk, 10 dk
4. gün: 25 m/dk, 20 dk
5. gün: 25 m/dk, 30 dk

6 haftalık antrenman periyodu boyunca tüm egzersizler 08:30-12:30 saatleri arasında yaptırıldı ve hayvanların her gün aynı saatlerde antrenman yapmaları sağlandı.

2.4.2. Akut Egzersiz Protokolü

Akut egzersiz gruplarındaki hayvanlara 30 m/dk (1,8 km/saat) hızda tükeninceye kadar egzersiz yaptırıldı. Sıçanlarda bu hızın VO_{2max} 'in yaklaşık % 65'ine karşılık geldiği bildirilmiştir (Demirel ve ark 2001). Hayvanların elektrikli ızgara üzerinde sırt üstü yatarak geri dönme reflekslerinin kaybolması (Gul ve ark 2002) veya manuel teşvike rağmen elektrikli ızgaradan bant üzerine dönememeleri tükenme kriteri olarak kullanıldı. Egzersiz bitiminde egzersiz süresi kaydedildi. Bu gruplardaki hayvanlara akut egzersizden önceki hafta, 3 gün birer gün ara ile 15 m/dk (0,9 km/saat) hızda 15 dakika koşu bandında alıştırma protokolü uygulandı. Akut egzersiz alıştırma protokolünden 72 saat sonra yaptırıldı.

2.4.3. Kontrol Grubu

Kontrol grubundaki sıçanlara koşu bandının, elektrik şokunun ve hayvanları ele almanın oluşturduğu stresi bertaraf etmek amacıyla haftada 2 defa 15 m/dk (0,9 km/saat) hızda 5 dakika egzersiz yaptırıldı.

Çalışma periyodu boyunca, kronik egzersiz grubundan 1 sıçan ayağında koşamayacak derecede hasar oluştuğu için, 1 sıçan öldüğü için, akut egzersiz grubundan 3 sıçan ve kontrol grubundan da 1 sıçan öldükleri için çalışmadan çıkarıldı. Sıçanların başlıca ölüm nedenleri kafes içerisinde kendi aralarındaki kavgalarına bağlı olarak ortaya çıkan komplikasyonlar ve metabolik nedenlerdi.

2.5. Çalışmanın Sonlandırılması ve Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışmanın sonunda akut egzersiz grubu olan 3. ve 6. gruplardaki (sırasıyla CAE ve GAE) hayvanlardan egzersizden hemen sonra, kronik egzersiz grubu olan 2. ve 5. gruplardaki (sırasıyla CCE ve GCE) hayvanlardan ise egzersizin akut etkilerinin ortadan kalkması için son egzersizden 24 saat sonra kan örnekleri alındı. Altı haftalık uygulamanın sonunda 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg ksilazin anestezisi altında kalpten 10-12 ml kan örneği alındı. Kan örneği alındıktan sonra servikal dislokasyon yöntemi ile ötanazi gerçekleştirildi. Diurnal etkiyi ortadan kaldırmak için tüm hayvanların sakrifikasyonu aynı saatler arasında yapıldı (09:30-12:30).

Alınan kan örnekleri hızlı bir şekilde EDTA'lı tüplere aktarıldı ve 1000 g'de (2750 rpm) 10 dakika +4 °C'de santrifüj (Nüve NF 1000R, Türkiye) edildi. Bu işlem sonunda elde edilen plazma eşit şekilde 4 ependorf tüpüne bölünerek ilgili parametrelerin ölçümleri yapılana kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

2.6. Biyokimyasal Analizler

2.6.1. Kullanılan Cihazlar

- Soğutmalı santrifüj: Hettich Universal 30 RF
- Spektrofotometre: Shimadzu UV - 1601
- Ayarlanabilir otomatik pipetler

- d. Vorteks
- e. Benmari
- f. Hassas terazi
- g. Manyetik karıştırıcı ve manyetik bar
- h. Damıtma cihazı

2.6.2. Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler

MDA reaktifleri

- % 0,675'lik TBA çözeltisi
- % 10'luk TCA
- 1,1,3,3-tetrametoksipropan

NO reaktifleri

- Kadmiyum granülleri
- Glisin-NaOH Tamponu (pH 9.7)
- Sülfanilamid
- N-Naftiletilen diamin
- CuSO₄ Solüsyonu (5 mmol/L)
- H₂SO₄ Solüsyonu (0.1 mol/L)
- Standart solüsyonu (KNO₃0.1 mol/L)
- ZnSO₄ (75 mmol/L)
- NaOH (55 mmol/L)
- Nitrit standart grafiği

XO reaktifleri

- Fosfat tamponu (50 mM, pH 7.5, 0.5mM Na₂EDTA'lı)
- Ksanthine (4 mM)
- Triklor asetik asit (TCA) (% 100, w/v)

ADA reaktifleri

- Buffer adenozin solüsyonu (pH 6.5, 20 mM)
- Adenozin
- Fosfat tamponu

- Alkale hipoklorit solüsyonu
- 11 mM NaOCl
- 125 mM NaOH
- Distile su
- Fenol-nitroprussid solüsyonu
- 106 mM fenol
- 0.17 mM Na-nitroprussid
- Amonyum sülfat standart solüsyonu (75 µM)

SOD reaktifleri

- ELISA enzimatik kiti (Cayman Chemical Company, ABD).

GPx reaktifleri

- ELISA enzimatik kinetik kiti (Cayman Chemical Company, ABD).

2.6.3. Kullanılan Analiz Yöntemleri

Malondialdehit (MDA) ölçümü

MDA seviyeleri Wasowicz ve arkadaşlarının (1993) metodu ile tiobarbitürik asit (TBA) reaktivitesi yöntemi kullanılarak ölçüldü. Yağ asidi peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek sıcak ve alkali ortamda, 532 nm’de maksimum absorban veren renkli kompleks oluşturur. Oluşan kompleksin okunan absorbanından faydalanılarak MDA değerleri elde edilir.

Tüplere 2,5 ml % 10’luk (w/v) TCA çözeltisi koyulduktan sonra kör tüpüne 0,5 ml distile su, numune tüpüne ise 0,5 ml numune konularak vorteksle karıştırıldı. Tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra 90 °C’lik su banyosunda 15 dakika bekletildi. Tüpler soğutulduktan sonra 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatanlardan 2 ml alınıp üzerine % 0.675’lik (w/v) TBA çözeltisinden 1 ml eklendi. 90 °C’lik su banyosunda tekrar 15 dakika bekletildikten sonra tüpler soğutuldu. Her numunenin 532 nm’de köre karşı absorbanları okutuldu.

1,1,3,3-tetramethoxypropane’nın değişik konsantrasyonları ile hazırlanan standart grafiğinden faydalanılarak MDA düzeyleri µmol/L olarak hesaplandı.

Nitrik oksit (NO) ölçümü

Endojen olarak üretilen nitrik oksitin doku ve vücut sıvılarındaki konsantrasyonu pek çok çalışmada nitrit ve nitrat olarak ifade edilmiştir (Mueller ve ark 1994). Çünkü nitrik oksit, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrite (NO_2^-), daha sonra da nitrate (NO_3^-) dönüşür.

Total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metoduyla değerlendirildi. pH 9.7 glisin tamponunda bakır kaplı kadmiyum granülleri deproteinize numune süpernatanı ile 90 dakikalık inkübasyon sonunda nitrat redüksiyonu sağlandı. Üretilen nitrit, sülfanilamid ve buna bağlı N-naphthylethylene diamin (NNDA) diazotizasyonu ile reaksiyon sonucu oluşan pembe rengin optik dansitesi (OD) spektrofotometrede 545 nm dalga boyunda okundu. Standart solüsyonlarından (0.1, 0.2, 0.5, 1, 4, 8, 15, 30, 50 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonlardaki standart KNO_3 solüsyonları) faydalanılarak hazırlanan “Optik Dansite (OD) - mmol/L” grafiğinden numune sonuçları mmol/L cinsinden belirlendi.

Ksantin oksidaz (XO) ölçümü

XO (EC 1.1.3.22) aktivitesi Prajda ve Weber’in (1975) metoduna göre çalışıldı. Bu metotta XO aktivitesi numunede bulunduğu farz edilen XO’nun ortamdaki ksantinden ürik asit oluşturması esasına dayanır. Oluşan ürik asit miktarı, % 100'lük TCA solüsyonunun eklenmesi ile sabitlenir. Spektrofotometrede 313 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülür. Böylece 30 dakika içerisinde üretilen ürik asit miktarı belirlenir ve plazma XO aktivitesi U/mL cinsinden ifade edilir.

Adenozin deaminaz (ADA) ölçümü

Plazma adenozin deaminaz aktivitesi Giusti’nin (1974) yöntemine uygun olarak çalışıldı. Fosfat tampon, tamponlanmış adenosin, distile su, amonyum sülfat, standart gibi maddeler kullanılır, 37 °C’de 60 dakikalık inkübasyon dönemi önemlidir ve çok dikkatlice ve seri bir şekilde pipetleme zorunludur. Fenol-nitroprussid ve alkalin hipoklorit solüsyonlarının kullanıldığı 30 dakikalık 37 °C’deki ikinci inkübasyon sonrasında spektrofotometrede 625 nm dalga boyunda tüm numunelerin OD’si okundu. İnkübasyon volümü 1.05 ml, final volüm 7.05 ml’dir. Bir ünite enzim aktivitesi 37 °C’de bir dakikada 1 mM adenozinin deaminasyonunu

sağlayabilen enzim miktarıdır. Bu tanımlamaya uygun olarak sonuçlar U/L cinsinden hesaplandı.

Süperoksit dismutaz (SOD) ölçümü

Süperoksit dismutaz aktivitesi ELISA enzimatik kit yöntemiyle çalışıldı (Cayman Chemical Company, USA). Kit yöntemi, ksantin / ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgenmesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri ortamdaki NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgenme meydana gelmektedir. Ortamda SOD bulunduğunda ise NBT indirgenmesi olmayıp enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır. Cayman SOD analiz kitiyle yaptığımız analizde 96'lık ELISA plate'inde tüm absorbans değerleri ELISA okuyucusunda 450 nm'de okundu. Standartlardan yararlanarak elde edilen SOD grafiğinden absorbans değerlerinin karşılığı olan aktivite değerleri U/ml cinsinden saptandı.

Glutatyon peroksidaz (GPx) aktivite ölçümü

Glutatyon peroksidaz aktivitesi ELISA enzimatik kinetik kit yöntemiyle çalışıldı (Cayman Chemical Company, USA). Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir ve bu esnada NADPH da $NADP^{+}$ 'ye yükseltgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın $NADP^{+}$ 'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır. Cayman glutatyon peroksidaz kitiyle yaptığımız analizde 96'lık ELISA plate'inde bu absorbans azalması her 60 saniyede bir olmak üzere ardışık olarak birer dakika aralıklarla ELISA okuyucusunda yapılan 5 okumayla saptandı. Bu absorbans azalmasının 0.051 absorbans ünite/dakika olduğu (pozitif kontrollerle sağlanan) 60 saniyelik zaman aralığındaki değerlerin formüle konulması ile GPx aktivite sonuçları nmol/dak/ml cinsinden hesaplandı. Bu formülasyon aşağıdaki gibidir:

$$\text{GPx aktivitesi} = (\text{Absorbans değişimi}/0.00373 \mu\text{M}^{-1}) * (0.19 \text{ ml}/0.22 \text{ ml}) * \text{Numune dilüsyonu}$$

2.7. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistik analizi SPSS 15.0 for Windows programı ile yapıldı. Bulgular ortalama±standart sapma (SS) şeklinde verildi. Verilerin normal dağılım gösterdikleri belirlendi. Oksidatif stres ve antioksidan belirteçlerinin egzersiz ve GSE ile ilişkili etkileşimlerini göstermek için iki yönlü varyans analizi ve ardından post hoc Bonferroni düzeltmeli tek yönlü varyans analizi ve Tukey testi uygulandı.

Akut egzersiz grubundaki sıçanların egzersiz süreleri Student'in t testi ile karşılaştırıldı. Sıçanların vücut ağırlıkları karşılaştırılırken başlangıç ve 6. haftadaki vücut ağırlıkları tek yönlü varyans analizi ve Tukey testi ile karşılaştırıldı. Sıçanların 6 haftalık vücut ağırlığı değişiminde, sıçanlar rasgele olarak seçilmelerine rağmen başlangıç vücut ağırlıkları farklı olduğu için farkların farkı karşılaştırıldı. Önce kovarians analizi, ardından da post-hoc Tukey testi (ANOVA) yapılarak farklar karşılaştırıldı. P değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Vücut Ağırlığı Üzerine Etkileri

6 haftalık çalışma periyodunda sıçanların vücut ağırlıklarında meydana gelen değişimler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmanın başlangıcında ve 6. haftanın sonunda sıçanların vücut ağırlıkları ve 6 haftalık ağırlık değişimleri.

	C (Grup 1) n=9	CCE (Grup 2) n=10	CAE (Grup 3) n=9	GC (Grup 4) n=10	GCE (Grup 5) n=10	GAE (Grup 6) n=10
Başlangıç (g)	227,1±22,6	257,0±32,9	266,7±28,7 ^{a,c}	225,2±15,9	248,8±22,1	236,4±30,0
6. hafta sonunda (g)	262,7±34,6	289,8±40,1	317,3±32,0 ^{a,c}	270,4±13,8	311,6±28,1 ^a	304,0±34,3
6 haftalık ağırlık değişimi (g)	35,6±12,0	32,8±7,2	50,6±3,3	45,2±2,1	62,8±6,0^b	67,6±4,3^{a,b}

^aC’ye göre P<0,05

^bCCE’ye göre P<0,05

^cGC’ye göre P<0,05

Sıçanların başlangıç vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında, CAE grubunun ortalama vücut ağırlığı (266,7±28,7 g), C (227,1±22,6 g) ve GC (225,2±15,9 g) gruplarına göre daha yüksekti (P<0,05). Diğer gruplar arasında başlangıç ağırlıkları bakımından herhangi bir fark yoktu.

Sıçanların 6. haftanın sonundaki vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında, CAE grubunun ortalama vücut ağırlığı (317,3±32,0 g), C (262,7±34,6 g) ve GC gruplarına kıyasla yüksek iken, GCE (311,6±28,1 g) grubunun ortalama vücut ağırlığı C (262,7±34,6 g) grubuna göre yüksekti (P<0,05). Diğer gruplar arasında 6. haftanın sonundaki vücut ağırlıkları bakımından fark yoktu.

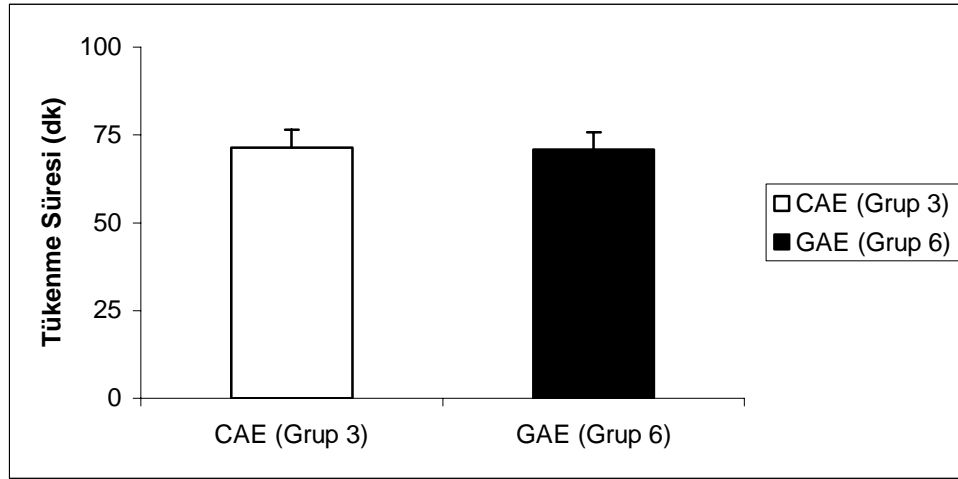
C, CCE, CAE ve GC grupları arasında 6 haftalık vücut ağırlığı değişimi bakımından fark yoktu. Başlangıca göre 6 haftalık vücut ağırlığı artışı C grubunda % 16, CCE grubunda % 13, CAE grubunda % 19 ve GC grubunda % 20 idi.

GCE grubunun vücut ağırlığı artışı ($62,8\pm6,0$ g) CCE grubuna ($32,8\pm7,2$ g) kıyasla 6. haftanın sonunda daha yüksek idi ($P<0,05$). Başlangıca göre vücut ağırlığı artışı CCE grubunda % 13, GCE grubunda % 25 idi.

GAE grubunun 6 haftalık vücut ağırlığı artışı ($67,6\pm4,3$ g) hem C ($35,6\pm12,0$ g) hem de CCE ($32,8\pm7,2$ g) gruplarına kıyasla daha yüksek idi ($P<0,05$). Başlangıca göre vücut ağırlığı artışı C grubunda % 16, CCE grubunda % 13 ve GAE grubunda % 29 idi. CAE ve GAE grupları arasında ise 6 haftalık vücut ağırlığı değişimi bakımından fark yoktu.

3.2. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Akut Egzersizde Tükenme Süresi Üzerine Etkisi

Akut egzersiz yapan gruplar (CAE ve GAE grupları) arasında tükenme süreleri bakımından fark yoktu (CAE ve GAE gruplarında sırasıyla $71,4\pm16,2$ dk ve $70,8\pm13,3$ dk) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. CAE ve GAE gruplarının tükenme süreleri.

3.3. Akut ve Kronik Egzersizde Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Belirteçleri Üzerine Etkileri

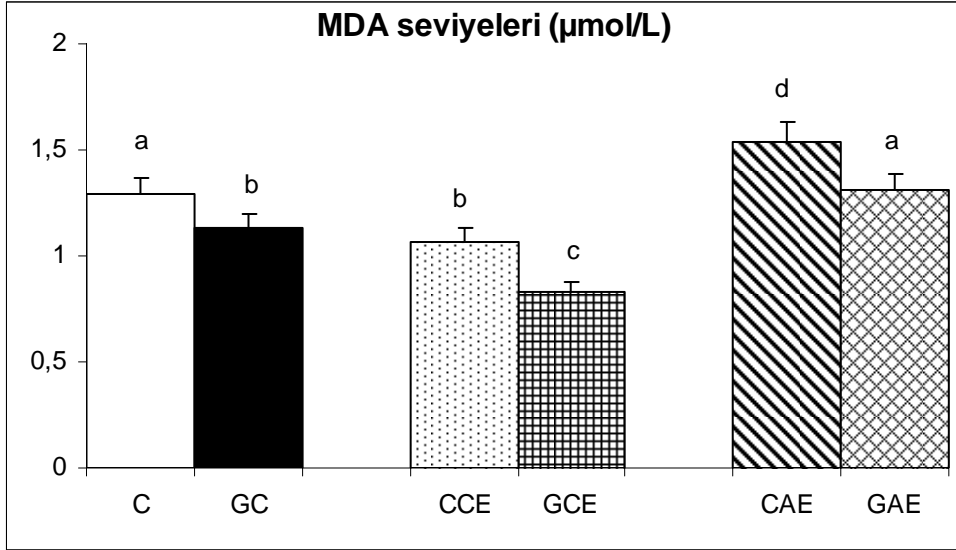
GSE verilen ve verilmeyen sıçanlarda akut ve kronik egzersiz sonrasında oksidatif stres ve antioksidan savunma belirteçlerinde meydana gelen değişiklikler Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Üzüm çekirdeği ekstrenin akut ve kronik egzersizde oksidatif stres ve antioksidan savunma belirteçleri üzerine etkileri.

	C (Grup 1) n=9	CCE (Grup 2) n=10	CAE (Grup 3) n=9	GC (Grup 4) n=10	GCE (Grup 5) n=10	GAE (Grup 6) n=10
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	1,29 \pm 0,05 ^a	1,07 \pm 0,04 ^b	1,54 \pm 0,08 ^c	1,13 \pm 0,05 ^b	0,83 \pm 0,06 ^d	1,31 \pm 0,05 ^a
XO (U/mL)	0,22 \pm 0,07 ^a	0,24 \pm 0,06 ^a	0,41 \pm 0,05 ^b	0,23 \pm 0,06 ^a	0,22 \pm 0,09 ^a	0,27 \pm 0,04 ^a
ADA (U/L)	14,17 \pm 2,25 ^a	16,01 \pm 4,61 ^a	25,98 \pm 2,77 ^b	15,18 \pm 4,31 ^a	17,07 \pm 4,59 ^a	17,04 \pm 4,45 ^a
NO (mmol/L)	75,00 \pm 8,71 ^a	95,15 \pm 6,10 ^b	78,77 \pm 6,80 ^a	94,22 \pm 7,77 ^b	116,91 \pm 8,48 ^c	100,90 \pm 13,69 ^b
SOD (U/mL)	0,903 \pm 0,05 ^a	1,260 \pm 0,02 ^b	0,704 \pm 0,03 ^c	1,088 \pm 0,05 ^d	1,419 \pm 0,04 ^e	0,908 \pm 0,07 ^a
GPx (nmol/dk/mL)	99,19 \pm 7,28 ^a	137,87 \pm 19,28 ^b	77,13 \pm 5,67 ^c	110,32 \pm 3,43 ^a	166,96 \pm 17,51 ^d	98,01 \pm 5,99 ^a

* Aynı satırda değişik harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel yönden önemlidir (P<0,05).

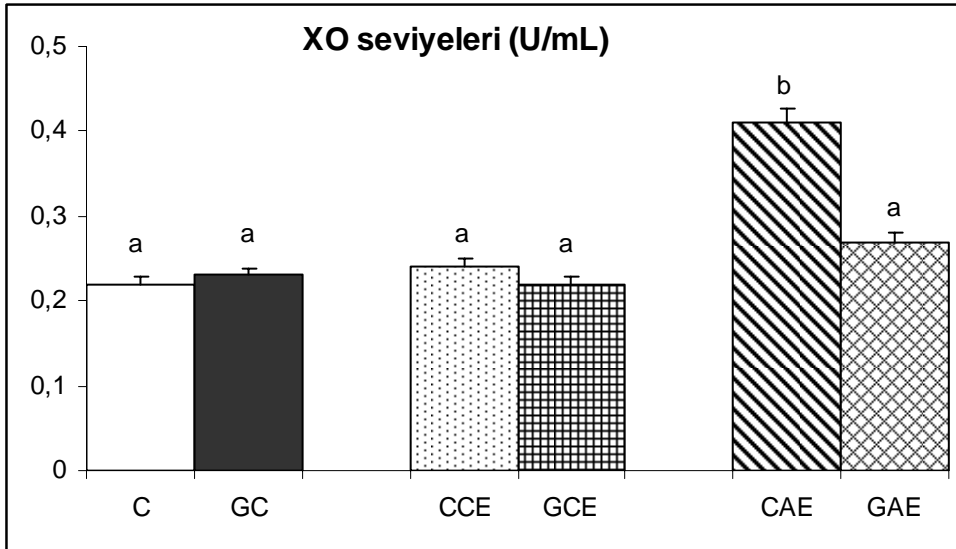
GSE verilen ve verilmeyen gruplarda akut ve kronik egzersiz ile MDA seviyelerinde meydana gelen değişiklikler Çizelge 3.2 ve Şekil 3.2’de verilmiştir. MDA seviyeleri CCE grubunda C grubuna kıyasla düşük iken, CAE grubunda C ve CCE gruplarına göre yüksekti ve tüm gruplar içerisinde en yüksek MDA seviyeleri bu grupta idi. GC grubunda MDA seviyeleri hem C grubundan hem de CAE grubundan düşüktü. GC ile CCE grupları arasında fark yoktu. GCE grubunda MDA azalması CCE grubuna kıyasla daha belirgindi ve MDA seviyeleri tüm gruplar arasında GCE grubunda en düşüktü. GAE grubunda MDA seviyeleri C grubundan farklı değil iken, CAE grubuna kıyasla düşük, CCE, GC ve GCE gruplarından yüksekti.



Şekil 3.2. MDA seviyelerinde akut ve kronik egzersiz ve GSE takviyesi ile meydana gelen değişiklikler.

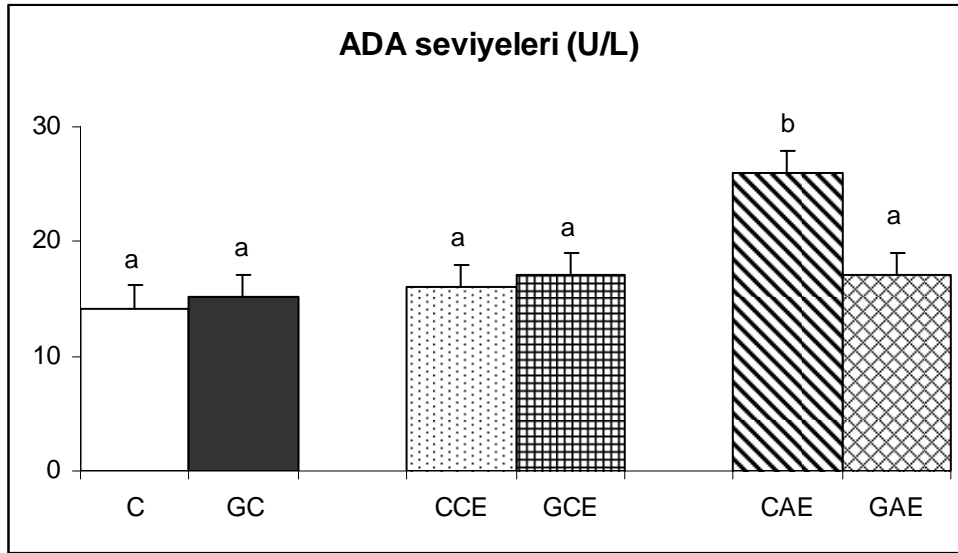
Aynı harfi içermeyen sütunlar istatistiksel olarak farklıdır (P<0,05).

XO ve ADA aktiviteleri CAE grubunda diğer gruplardan yüksekti (Çizelge 3.2, Şekil 3.3 ve 3.4). XO ve ADA aktiviteleri C, CCE, GC, GCE ve GAE gruplarında birbirlerinden farklı değildi.



Şekil 3.3. XO seviyelerinde akut ve kronik egzersiz ve GSE takviyesi ile meydana gelen değişiklikler.

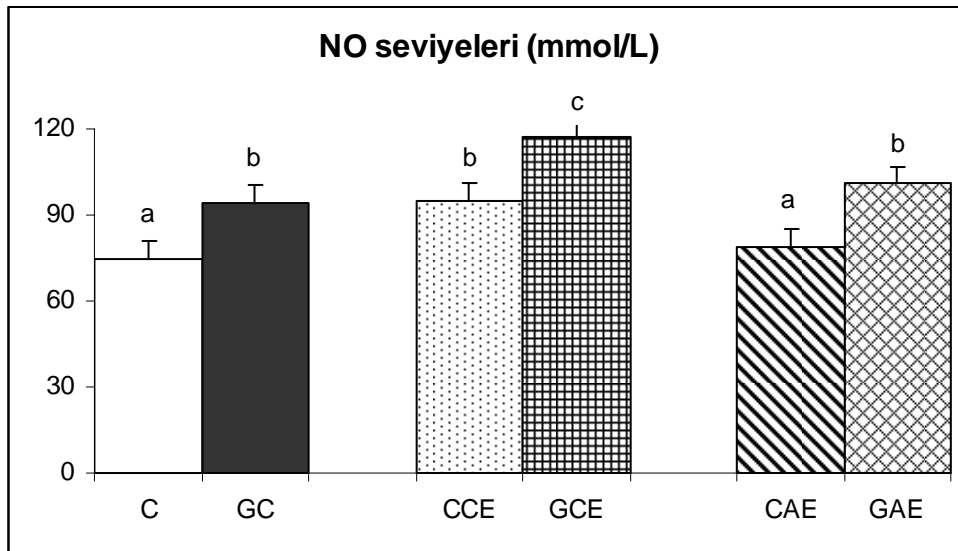
Aynı harfi içermeyen sütunlar istatistiksel olarak farklıdır (P<0,05).



Şekil 3.4. ADA seviyelerinde akut ve kronik egzersiz ve GSE takviyesi ile meydana gelen değişiklikler

Aynı harfi içermeyen sütunlar istatistiksel olarak farklıdır (P<0,05).

NO seviyeleri CCE grubunda C ve CAE gruplarına göre yüksekti. CAE ve C grupları arasında NO seviyeleri bakımından fark yoktu. GC ve GAE gruplarındaki NO seviyeleri CCE grubundan farklı değilken C ve CAE gruplarından yüksekti. Tüm gruplar arasında en yüksek NO seviyeleri GCE grubunda idi (Çizelge 3.2, Şekil 3.5).

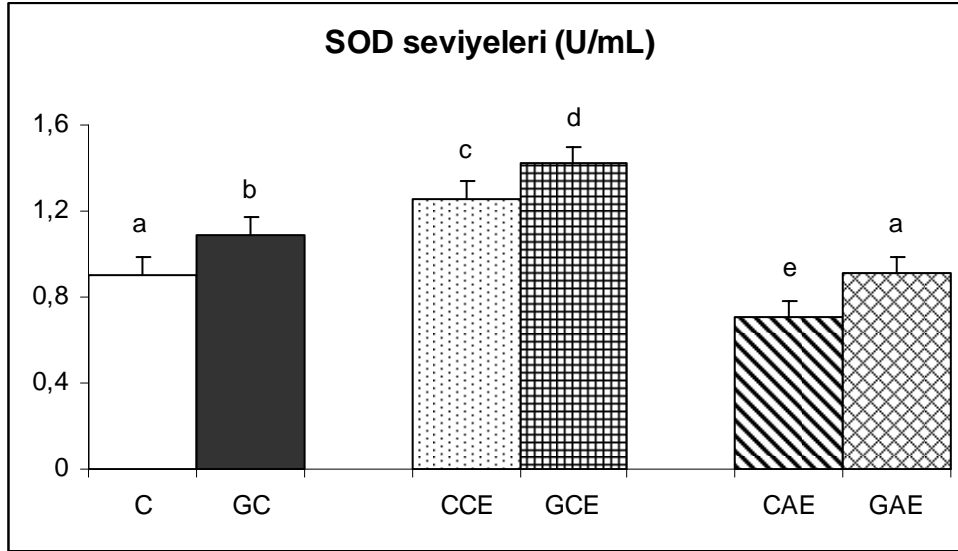


Şekil 3.5. NO seviyelerinde akut ve kronik egzersiz ve GSE takviyesi ile meydana gelen değişiklikler.

Aynı harfi içermeyen sütunlar istatistiksel olarak farklıdır (P<0,05).

SOD aktivitelerinde akut ve kronik egzersiz ve GSE takviyesi ile meydana gelen değişiklikler Çizelge 3.2 ve Şekil 3.6'da verilmiştir. SOD aktivitesi CCE

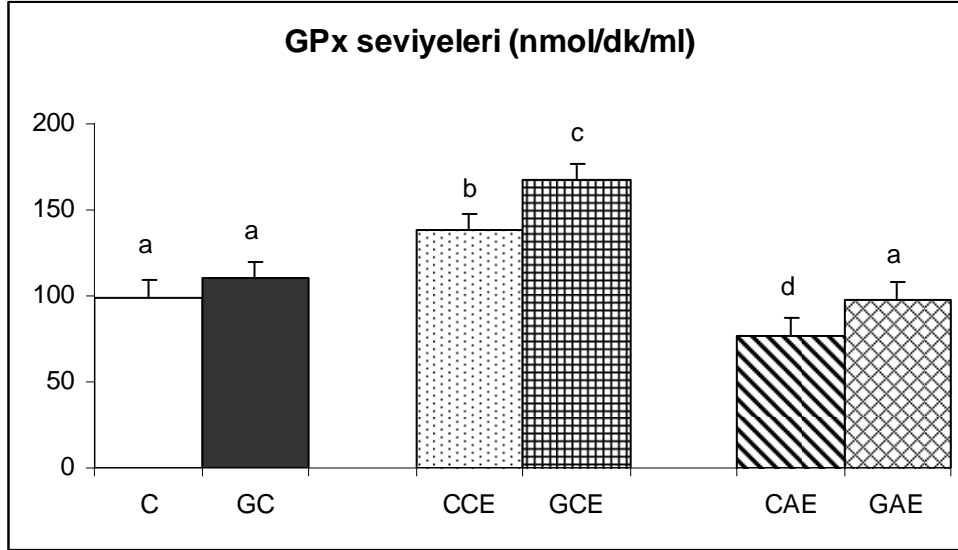
grubunda C grubuna göre yüksek iken, CAE grubunda diğer bütün gruplara kıyasla düşüktü. GC grubunda SOD aktivitesi C ve CAE gruplarına kıyasla yüksek iken CCE grubuna kıyasla düşük bulundu. En yüksek SOD aktivitesi GCE grubunda idi. GAE grubundaki SOD aktivitesi C grubundan farklı değilken CAE grubuna kıyasla yüksekti, CCE, GC ve GCE gruplarına kıyasla ise düşüktü.



Şekil 3.6. SOD seviyelerinde akut ve kronik egzersiz ve GSE takviyesi ile meydana gelen değişiklikler.

Aynı harfi içermeyen sütunlar istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0,05$).

GPx aktivitelerinde akut ve kronik egzersiz ve GSE takviyesi ile meydana gelen değişiklikler Çizelge 3.2 ve Şekil 3.7’de verilmiştir. GPx aktivitesi CCE grubunda C grubuna göre yüksek, CAE grubunda C ve CCE gruplarına kıyasla düşüktü. GC ve GAE gruplarında GPx aktiviteleri C grubundan farklı değilken, CCE grubundan daha düşük, CAE grubundan ise yüksekti. En yüksek GPx aktivitesi GCE grubunda idi.



Şekil 3.7. GPx seviyelerinde akut ve kronik egzersiz ve GSE takviyesi ile meydana gelen değişiklikler.

Aynı harfi içermeyen sütunlar istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0,05$).

GSE alan kontrolleri ile karşılaştırıldığında, GCE grubunda CCE grubuna göre MDA daha düşük, NO, SOD ve GPx daha yüksek idi. GC grubunda ise C grubuna kıyasla MDA seviyeleri düşükken, NO ve SOD düzeyleri yüksekti. C, GC, CCE ve GCE grupları arasında XO ve ADA seviyeleri bakımından fark yoktu. CAE grubunda görülen MDA, XO ve ADA artışı ile SOD ve GPx azalması GAE grubunda görülmemiş, buna karşılık NO seviyeleri GAE grubunda yükselmiştir.

4. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalarda yeşil çay, ginseng, sarımsak ve GSE gibi fitokimyasalların antioksidan özelliklerine ilgi giderek artmaktadır. Bununla birlikte egzersizle ve antrenmanla meydana gelen değişiklikler üzerine bu maddelerin etkileri sadece az sayıda çalışmada araştırılmıştır.

Üzüm çekirdeği proantosiyanidinlerinin geniş biyolojik ve farmakolojik özelliklerinden dolayı son yıllarda çok sayıda çalışma yapılmaktadır (Shao ve ark 2003). Ancak GSE'nin egzersiz performansı ve egzersizin neden olduğu oksidatif stres ve antioksidan savunma üzerine etkilerini araştıran çalışma bulunmamaktadır. Bu tezin amacı akut ve kronik egzersiz yaptırılan sıçanlarda GSE takviyesinin vücut ağırlığı değişimi, egzersiz performansı ve çeşitli oksidatif stres ve antioksidan savunma belirteçleri üzerine etkilerini araştırmaktır.

4.1. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Vücut Ağırlığı Üzerine Etkileri

GSE takviyesi yapılan ve yapılmayan kontrol grupları arasında vücut ağırlığı artışı bakımından fark yoktu. Vücut ağırlığı artışı GSE takviyesi yapılan kronik egzersiz grubunda kendi kontrolüne, GSE takviyesi yapılan akut egzersiz grubunda ise kontrol ve kronik egzersiz kontrol gruplarına göre daha fazla idi.

GSE takviyesinin vücut ağırlığı üzerine etkisi insanlarda ve sıçanlarda araştırılmış ve genel olarak GSE takviyesi ile vücut ağırlığının azaldığı veya değişmediği gösterilmiştir (Moreno ark 2003, Vogels ve ark 2004, Balu ve ark 2006). Hayvan modellerinde GSE'de bulunan polifenollerin besin alımını azalttığı (Tebib ve ark 1996, Wielinga ve ark 2002) ve vücut ağırlığı artışını önlediği (Tebib ve ark 1996) iddia edilmiştir. In vitro deneylerde bu polifenollerin lipolizi uyardığı gösterilmiş (Tebib ve ark 1996, Ardevol ve ark 2000) ve bunun özellikle lipolizin azaldığı obez bireylerde etkili olabileceği iddia edilmiştir (Vogels ve ark 2004).

Balu ve ark (2006) 30 gün boyunca oral olarak 100 mg/kg GSE verilen genç ve yaşlı sıçanların vücut ağırlığında değişiklik olmadığını göstermişlerdir. Benzeri şekilde Yamakoshi ve ark (2002) ve Deshane ve ark (2004) GSE uygulamasının vücut ağırlığında değişikliğe sebep olmadığını bildirmişlerdir. Hiperkolesteremik sıçanlarda 10 hafta boyunca 50 ve 100 mg/kg oral GSE uygulamasının vücut ağırlığı ve besin alımı üzerine etkisi olmamıştır (Vinson ve ark 2002). Hipoksiye maruz bırakılan yavru sıçanlarda i.p. olarak uygulanan 25 ve 50 mg/kg GSE'nin vücut ağırlığı üzerine etkisi olmamıştır (Feng ve ark 2005). İntraperitoneal yolla verilen proantosiyanidinlerin etkinliğinin intragastrik yola göre 10-20 kat daha az olduğu bildirilmiştir (Singh ve ark 2004). Biz de çalışmamızda emilimi intraperitoneal yola göre daha fazla olduğu için GSE'yi içme suyuna karıştırmak suretiyle oral yoldan verdik.

Yaklaşık 1 yıl boyunca GSE, niasin bağlı krom ve çinko karışımı ile beslenen sıçanlarda çalışma periyodu boyunca vücut ağırlığında ve kalp, böbrek ve karaciğer dokularının ağırlıklarında kontrollere kıyasla değişiklik olmamıştır. Bununla birlikte, takviye yapılan grupta epididimal yağ kütlesinin azaldığı ve bu duruma GSE'den ziyade kromun neden olduğu bildirilmiştir (Preuss ve ark 2001). 47 gün boyunca farklı dozlarda GSE ile beslenen sıçanlarda kontrollere kıyasla vücut ağırlığında ve haftalık besin alımında değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Morin ve ark 2008). Benzer şekilde 3 ay boyunca diyete % 0,63, % 1,25 ve % 2,5 oranında karıştırılarak verilen GSE'nin erkek ve dişi sıçanlarda vücut ağırlığı ve vücut ağırlığı artışı üzerine etkisinin kontrollerden farklı olmadığı gösterilmiştir (Bentivegna ve Whitney 2002). Çalışmamızda GSE takviyesi yapılan kontrol grubundaki sıçanların vücut ağırlıklarının GSE takviyesi yapılmayan kontrol, kronik ve akut egzersiz gruplarındaki sıçanlardan farklı olmaması da bu sonuçları desteklemektedir.

Bu sonuçların aksine, sıçanlarda yapılan bir çalışmada (Tebib ve ark 1996), GSE verilen sıçanlarda ağırlık artışının kontrollere kıyasla daha az olduğu gösterilmiş ve ağırlık artışının daha az olmasının muhtemel nedeni olarak üzüm çekirdeğinde bulunan tanenlerin besinlerin sindirilebilirliğini ve emilimini azaltması olduğu iddia edilmiştir. Sıçanlarda yapılan diğer bir çalışmada (Wielinga ve ark 2002), üzüm çekirdeği

metabolizmada değişiklik yapmaksızın besin alımını azaltmıştır. İnsanlarda yapılan bir çalışmada (Vogels ve ark 2004) ise GSE'nin normal ve aşırı kilolu bireylerde tokluk duygusu sağlayarak enerji alımını azalttığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda akut egzersiz grubundaki sıçanlar sadece bir defa egzersiz yaptığından ve bu hayvanların vücut ağırlıkları akut egzersiz protokolünden hemen önce kaydedildiğinden bu grubun vücut ağırlığı bakımından kontrol grubundan farkı yoktu. Bununla birlikte, GSE takviyesi yapılan akut egzersiz grubundaki sıçanların vücut ağırlığı artışının hem kontrol hem de kronik egzersiz kontrol gruplarından yüksek olması, GSE'nin sıçanlarda besin alımını ve bunun sonucunda da toplam vücut ağırlığını artırdığı şeklinde yorumlanabilir. Wren ve ark (2002) GSE içeren diyetle beslenen erkek ve dişi sıçanlarda besin alımının kontrollere kıyasla fazla olduğunu bulmuşlardır. Ancak, dişi ve erkek sıçanlarda besin alımındaki artış vücut ağırlığına veya herhangi bir organın ağırlığına yansımamıştır. Çalışmamızda sıçanların günlük besin alımlarını kaydetmediğimizden sadece vücut ağırlığı değişimlerine göre yorum yapmaktayız.

Çalışmamızda kronik egzersiz yapan sıçanlarda GSE takviyesi, takviye yapılmayan kontrollerine kıyasla vücut ağırlığında artışa yol açmıştır. Sıçanlarda 6-10 haftalık koşu veya yüzme antrenmanı süresince vücut ağırlığının arttığı, bu artışın egzersiz yapmayan kontrollerden farklı olmadığı (Ravi Kiran ve ark 2004, Aksoy ve ark 2006) veya kontrollere göre daha az (Moraska ve ark 2000) olduğu gösterilmiştir. Ancak literatürde GSE'nin akut veya kronik egzersiz yapan insanlarda veya sıçanlarda vücut ağırlığı üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. GSE verilen kronik egzersiz grubundaki sıçanların vücut ağırlıklarındaki artışın GSE'nin düzenli egzersiz ile birlikte besin alımını artırmasına ve bunun sonucunda vücut ağırlığı artışına bağlı olduğu düşünülebilir.

Hayvanlarda keskin tatlarından ve birçok makrobesleyiciye bağlanarak sindirim ve emilimi azaltma özelliğinden dolayı proantosiyanidinlerin hayvan beslenmesinde anti-nutrient olarak değerlendirildiği bilinmektedir (Reed 1995). GSE bu özelliğinden dolayı besin alımını ve dolayısıyla vücut ağırlığı artışını azaltabilir. Elde ettiğimiz

sonuçlara dayanarak GSE'nin sıçanlarda bu dozda bir anti-nutrient olarak değerlendirilemeyeceğini düşünüyoruz.

4.2. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Akut Egzersizde Tükenme Süresi Üzerine Etkisi

Tükenme süreleri bakımından GSE takviyesi yapılan ve yapılmayan akut egzersiz grupları arasında fark yoktu. Bu da akut tüketici egzersizde GSE'nin tükenme süresini etkilemediğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu konu hakkında literatürde bilgi bulamadığımızdan GSE'nin egzersiz performansı üzerine etkisinin daha detaylı araştırılması gerektiğini düşünüyoruz.

Oksidatif stresin kas yorgunluğuna neden olduğu ve kas yorgunluğunun da çeşitli antioksidan takviyeleri ile ertelenebildiği iddia edilmiştir (Reid 2008). Antioksidanların egzersizle meydana gelen kas yorgunluğu üzerine etkisi birçok çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışmalarda gönüllülere E vitamini, C vitamini, β -karoten ve diğer makrobesleyiciler haftalarca, hatta aylarca verilmiş ve kas gücü, güç çıktısı ve yorgunluk gibi çeşitli parametreler egzersiz esnasında kaydedilmiştir. Sonuçta genel olarak oksidatif stres belirteçlerinin azaldığı, egzersiz performansının ise değişmediği gösterilmiştir (Reid 2008).

Literatürde GSE'nin egzersiz performansı üzerine etkisini araştıran çalışma bulunmadığından akut egzersiz yapan sıçanlardaki tükenme süreleri ile ilgili farklı takviyelerin veya farklı özelliklere sahip sıçanların kullanıldığı çeşitli çalışmaları karşılaştırdık. Sıçanlarda diyeteye % 0,2 ve % 0,5 oranında karıştırılan yeşil çay ekstresinin (büyük miktarda kateşin içerir) akut egzersizde tükenme süresini sırasıyla % 21 ve % 30 artırdığı gösterilmiştir (Murase ve ark 2006). L-arjinin takviyesi yapılan sıçanlarda akut egzersizde tükenme süresinin kontrollerden farklı olmadığı gösterilmiştir (Lin ve ark 2005). Akut egzersizde tükenme süreleri bakımından 4 hafta boyunca 300 mg/kg koenzim Q10 takviyesi yapılan sıçanlarla kontroller arasında fark olmadığı bildirilmiştir (Kon ve ark 2007). Kon ve arkadaşlarının (2007) çalışmasında bulunan tükenme süreleri (72 ± 3 ve 76 ± 3 dk) bizim çalışmamızdakilere benzerdi.

4.3. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Akut ve Kronik Egzersizde Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Belirteçleri Üzerine Etkileri

4.3.1. MDA Değişiklikleri

GSE'nin çeşitli ilaçların ve kimyasalların (Bagchi ve ark 1998a, Ye ve ark 1999, Joshi ve ark 2000), hipoksinin (Feng ve ark 2005, Feng ve ark 2007), X ışınlarının (Enginar ve ark 2007), iskemi-reperfüzyon hasarının (Sato ve ark 1999, Şehirli ve ark 2008) ve diyabetin (Pinent ve ark 2004, Stankovic ve ark 2008) neden olduğu oksidatif hasar sonucu yükselen MDA düzeylerini azalttığı birçok çalışmada gösterilmesine rağmen, akut veya kronik egzersizde gelişen oksidatif stres üzerine etkilerini araştıran çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda istirahat MDA seviyeleri GSE takviyesi yapılan kontrol grubunda yapılmayan kontrol grubuna kıyasla daha düşük idi. Bu da GSE'nin istirahatte lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermektedir.

MDA değerlerinin akut ve kronik egzersizle nasıl değiştiğini inceleyen çalışmalarda farklı sonuçlar ortaya konulmuştur. Bazı araştırmalarda (Davies ve ark 1982, Gül ve ark 2001, Lin ve ark 2005) akut egzersizle plazma, iskelet kası, karaciğer ve akciğer gibi dokularda MDA değerlerinin arttığı bildirilirken, MDA'nın değişmediğini (Leaf ve ark 1997, Child ve ark 1999, Dixon ve ark 2003, Quindry ve ark 2003), hatta azaldığını (Lovlin ve ark 1987, Kretschmar ve ark 1991) öne süren çalışmalar da mevcuttur. Antrenmanın etkisi ile ilgili olarak genel kabul gören görüş düzenli egzersiz sonucunda MDA değerinin azaldığı yönünde olmasına rağmen (Clarkson 1995), değişmediğini iddia eden çalışmalar da mevcuttur (Husain 2003).

Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgulara göre, MDA seviyeleri hem GSE takviyesi yapılan hem de yapılmayan akut egzersiz gruplarında egzersiz yapmayan kontrollerine göre yüksektir. Ancak GSE takviyesi yapılan akut egzersiz grubundaki MDA seviyesinin GSE takviyesi yapılmayan akut egzersiz grubundan düşük olması ve kontrol grubundan farklı olmaması, GSE takviyesinin akut egzersizin neden olduğu oksidatif hasarı azalttığını göstermektedir.

Tek devrelik egzersizin ROS ve RNS oluşumuna ve oksidatif hasara neden olduğu gösterilmiştir (Davies ve ark 1982, Radak ve ark 1999a). Akut tüketici egzersiz oksidasyon hasarına neden olur, özellikle kaslarda ve plazmada lipid peroksidasyonunu artırır ve antioksidan içeriğini azaltır (Lin ve ark 2005). Sıçanlarda uzun süreli yorucu yüzme egzersizinin oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir (Leeuwenburgh ve Ji 1998). Kısa süreli (90 dk) yüzme egzersizi yaptırılan sıçanlarda egzersiz sonrası serum MDA düzeylerinin yükseldiği bulunmuştur (Gül ve ark 2001). Sıçanlarda akut tüketici egzersizden sonra plazma MDA düzeylerinin kontrollere kıyasla yaklaşık % 72 arttığı bildirilmiştir (Lin ve ark 2005). Sıçanlarda akut tüketici koşu bandı egzersizinden 2 saat sonra plazma MDA düzeylerinin yükseldiği, egzersizden hemen sonra ve 1, 3 ve 4 saat sonra ise değişiklik olmadığı iddia edilmiş ve egzersiz sonrası kan alma döneminin de önemli olduğu ileri sürülmüştür (Antunes-Neto ve ark 2006). Alessio ve ark (1988) sıçanlarda 1 dakikalık hızlı koşunun (45 m/dk) yavaş ve hızlı kas liflerinde TBARS seviyelerini sırasıyla % 167 ve % 157, lipid hidroperoksitleri ise sırasıyla % 34 ve % 31 artırdığını bildirmişlerdir.

Bu sonuçların aksine, sıçanlarda 60 dakikalık yüzme egzersizinin plazma TBARS düzeylerini etkilemediği ve bu tip ve sürede bir egzersizin sıçanlarda sistemik bir oksidatif stres oluşturmak için yeterli olmadığı iddia edilmiştir (Silveira ve ark 2007). İnsanlarda aralarında 2 dakikalık dinlenme dönemleri bulunan 30 saniye süreli 6 zorlu zıplama egzersizi ile lipid peroksidasyon biyobelirteçlerinin artmadığı gösterilmiştir (Ortenblad ve ark 1997).

Egzersiz çalışmalarının sonuçlarındaki bu farklılık büyük ölçüde egzersizin tipine, şiddetine, sıklığına ve süresine (egzersiz protokollerinin farklılığına) bağlıdır. Yukarıda da belirttiğimiz gibi, farklı tiplerdeki egzersizlerin farklı seviyelerde oksidatif hasara neden olduğu iyi bilinmektedir. Biz bu çalışmada küçük hayvan deneylerinde aerobik egzersizin standart formu olan treadmill koşusunu seçtik. Yüzme egzersizini değil treadmill koşusunu seçmemizin nedeni yüzmenin farklı tiplerde streslere neden olması ve yüzme egzersizine verilen aerobik cevapların değişkenlik göstermesidir (Liu ve ark 2000).

Çalışmalarda sık kullanılan ve bizim de kullandığımız TBARS yönteminin MDA değerlerini olduğundan yüksek bulduğu iddia edilmektedir. Bu yöntemin diğer aldehitler, şekerler, amino asitler ve bilirubin ile reaktivitesi bunun nedeni olarak gösterilmiştir (Meagher ve Fitzgerald 2000). MDA düzeyinin plazmada kaslara kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir (You ve ark 2005). Bu iddialara rağmen standardize edilmiş olması, kolay çalışılabilir olması ve analiz maliyetlerinin düşüklüğü gibi sebeplerden dolayı halen pek çok çalışmada TBARS yöntemi kullanılmaktadır.

Yukarıda da belirttiğimiz gibi, GSE'nin akut ve kronik egzersizde oksidatif stres üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, genel olarak biyolojik antioksidanlar egzersizin neden olduğu oksidatif stresten hücrelerin korunmasında hayati rol oynarlar. Çeşitli antioksidan sistemlerin eksikliğinin veya olmamasının oksidatif doku hasarını şiddetlendirdiği, bazı antioksidanların takviyesinin ise farklı sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Banerjee ve ark 2003). E vitamini takviyesinin farklı şiddetlerde ve sürelerde yapılan egzersizleri takiben lipid peroksidasyonunu azalttığı insanlarda ve sıçanlarda gösterilmiştir (Dillard ve ark 1978, Sumida ve ark 1989, Meydani ve ark 1993, Goldfarb ve ark 1994). Bu sonuçların aksine, 2 hafta E ve C vitamini takviyesinden sonra 90 dakika yokuş aşağı koşu egzersizi yaptırılan sıçanlarda plazma MDA seviyelerinin egzersizden hemen sonra, 2 ve 48 saat sonra istirahate ve takviye yapılmayan kontrollere kıyasla farklı olmadığı iddia edilmiştir (You ve ark 2005). Tiidus ve ark (1993) E vitamini eksikliği olan ve E vitamini takviyesi yapılan antrenmansız dişi sıçanlar arasında akut egzersizden sonraki TBARS düzeyi bakımından fark olmadığını bulmuşlardır. Buna karşılık, 6,5 hafta boyunca içme suyuna karıştırılarak verilen yeşil çayın sıçanlarda akut tüketici egzersizden sonra böbrek dokusunda yükselen MDA seviyelerini kontrol seviyelerine indirdiği gösterilmiştir (Alessio ve ark 2002).

Sporcularda bisiklet ergometresinde yaptırılan submaksimal aerobik egzersiz testinden 15 dakika önce uygulanmaya başlanan ve 15 dakikada bir devam eden polifenollerce zengin içecek takviyesi alanlarda plazma MDA düzeyinde egzersizin neden olduğu artışın plasebo alanlara kıyasla daha az olduğu bildirilmiştir (Morillas-

Ruiz ve ark 2006). 7 gün boyunca yeşil çay içen antrenmanlı bireylerde lipid hidroperoksit seviyelerinin plasebo kullanımına göre hem istirahatte hem de egzersiz sonrasında azaldığı gösterilmiştir (Panza ve ark 2008).

Düzenli antrenmanın lipid peroksidasyonuna karşı direnci artırdığı ve oksidatif protein ve DNA hasarını azalttığı bilinmektedir (Leeuwenburgh ve ark 1998, Radak 1999b). GSE takviyesi yapılan kronik egzersiz grubunda MDA seviyelerinin GSE takviyesi yapılmayan kronik egzersiz grubuna kıyasla daha düşük olması GSE'nin egzersizin neden olduğu lipid peroksidasyonunu azaltıcı özelliğine bağlı görünmektedir. Antrenmana cevap olarak antioksidan enzim aktivitesinin artması, sistemin reaktif oksijen ve nitrojen türlerine karşı korumayı kolaylaştırmak için antioksidan oluşturma ihtiyacından dolayıdır. Hafif egzersiz adaptasyon sağlamada başarısız olur, çünkü oluşan reaktif oksijen ve nitrojen türleri antioksidan savunma sistemi tarafından yeterince elimine edilir. Yeterli şiddet ve sürede tekrarlanan egzersizlerin biriken etkileri sonucunda adaptasyon gerçekleşir (Bloomer ve Goldfarb 2004). Kontrol grubuna göre MDA azalırken, NO, SOD ve GPx arttığı için bu çalışmada uyguladığımız 6 haftalık antrenman periyodu sıçanlarda oksidatif strese karşı adaptasyon sağlamada yeterli görünmektedir.

GSE takviyesi yapılan gruplarda plazma MDA seviyelerinin kendi kontrollerine göre azalması GSE'nin antioksidan etkisini desteklemektedir.

4.3.2. XO Değişiklikleri

Şiddetli egzersiz vücudun belli bölgelerinde geçici iskemiye neden olur. İskemide intrasellüler XD enzimi sistein rezidülerinin modifikasyonu ve/veya kısmi proteoliz vasıtasıyla XO'ya dönüşür (Sachdev ve Davies 2008). XO bir metalloflavoproteindir (Liu ve ark 2005). XD bu enzimin dominant formudur. XO elektron akseptörü olarak NAD^{+} 'ı kullanamaz ve oksijeni direkt olarak süperoksit ve H_2O_2 'ye indirger. İskemi esnasında O_2 miktarı azalır ve intrasellüler XO ve hipoksantin konsantrasyonları yükselir. Reperfüzyon ile oksijen tekrar ortama girdiği zaman süperoksit ve H_2O_2 ortamdan ayrılır (Sachdev ve Davies 2008).

Tüketici egzersiz esnasında dolaşımdaki ve dokulardaki XO aktivitesi önemli ölçüde artar (Westing ve ark 1989, Kumar ve ark 1992, Radak ve ark 1995, Vina ve ark 2000, Liu ve ark 2005). Sıçanlarda tükeninceye kadar yaptırılan yüksek şiddette egzersizden sonra plazma XO aktivitelerinin 10 kattan fazla (Radak ve ark 1995) veya yaklaşık % 43 arttığı ve bu artışın allopurinol uygulaması ile önlendiği (Vina ve ark 2000) gösterilmiştir. Tüketici egzersizin XO aktivitesini artırmasının yanında dokularda pürinlerin ürik aside dönüşüm hızını da artırdığı gösterilmiştir (Hellsten-Westing ve ark 1994). Antrenmanlı bireylerde XO aktivitelerinin direnç egzersizlerinden sonra yükseldiği, egzersizden önceki 7 gün boyunca yeşil çay tüketiminin XO aktivitelerini kontrol düzeylerine yaklaştırdığı gösterilmiştir (Panza ve ark 2008).

Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak akut egzersiz grubunda XO aktiviteleri kontrollere ve kronik egzersiz gruplarına göre yüksekti. Bu, muhtemelen akut egzersiz sonucunda dokularda iskemi ve/veya hipoksi meydana gelmesine bağlıdır. Akut egzersiz yaptırılan sıçanlarda GSE takviyesi XO aktivitesindeki bu yükselişi engelleyerek normale yaklaştırmıştır. Bu da GSE'nin XD'nin XO'ya dönüşümünü inhibe ettiği veya dokuların iskemiye karşı direncini artırdığı şeklinde yorumlanabilir. GSE'nin iskemi reperfüzyon hasarının neden olduğu lipid peroksidasyonunu kalp (Sato ve ark 1999) ve böbrek (Nakagawa ve ark 2005) gibi dokularda azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda XO aktivitesi araştırılmadığı için elde ettiğimiz bu sonuç ayrıca önemlidir. Kronik egzersiz yapan sıçanlarda XO aktivitesinde değişikliğin olmaması ise egzersizin XO aktivitesi üzerine akut etkisinin sonraki 24 saat içerisinde ortadan kalktığını göstermektedir.

4.3.3. ADA Değişiklikleri

İnsanlarda ADA aktivitesinin MDA seviyesiyle pozitif, antioksidan enzimlerle ise negatif korele olduğu gösterilmiştir (Erkılıç ve ark 2003). Bu tez çalışmasından elde ettiğimiz bulgulara göre plazma ADA aktivitesi akut egzersizden sonra yükselmiştir. Ayrıca çalışmamızda akut egzersizden sonra MDA seviyesinin yükselmesi ve önceki çalışmalarda (Erkılıç ve ark 2003) MDA ve ADA aktiviteleri arasında pozitif korelasyon

olduğunun gösterilmesi de ADA aktivitesindeki yükselmeyi desteklemektedir. Sıçanların kalp dokusunda ADA aktivitesinin dayanıklılık antrenmanını takip eden tüketici egzersizden sonra arttığı, sprint antrenmanından sonra ise azaldığı gösterilmiş ve antrenman tipinin tüketici egzersizde kalpteki pürin nükleotid metabolizması üzerine etkili olabileceği iddia edilmiştir (Langfort ve ark 1996). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada (Rutkiewicz ve Gorski 1992), tüm kas lifi tiplerinde ADA aktivitesinin orta şiddetteki egzersizin başlangıcında azaldığı, sıçanlar tükendiği zaman ise kontrol seviyesinden farklı olmadığı iddia edilmiştir.

ADA aktivitesinin antioksidan takviyesi ile azaldığı çeşitli çalışmalarda (Bassini-Cameron ve ark 2007, Özyurt ve ark 2006, Özyurt ve ark 2001) gösterilmiştir. Deneysel olarak iskelet kasında ve böbrekte iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçanlarda doku ve plazma ADA aktivitelerinin arttığı, kafeik asit fenil ester takviyesinin yükselen ADA aktivitelerini normale yaklaştırdığı gösterilmiştir (Özyurt ve ark 2006, Özyurt ve ark 2001). Çalışmamızda GSE takviyesi ise sıçanlarda akut egzersiz sonucu yükselen ADA aktivitelerini kontrol değerlerine yaklaştırmıştır. Bu durum da GSE'nin antioksidan etkisini desteklemektedir. Kronik egzersiz ile birlikte GSE takviyesi yapılan ve yapılmayan sıçanlarda ADA aktivitesinde herhangi bir değişikliğin olmaması 24 saat içerisinde egzersizin akut etkilerinin ortadan kalktığını göstermektedir.

4.3.4. NO Değişiklikleri

Akut egzersiz grubunun NO düzeyi kontrol grubundan farklı değilken, takviye yapılan ve yapılmayan kronik egzersiz gruplarında NO düzeylerinin kontrol grubundan yüksek olması ve hem GSE takviyesi yapılan hem de kronik egzersiz yaptırılan grupta NO düzeyinin en yüksek olması, gerek GSE'nin gerekse kronik egzersizin plazma NO düzeylerini yükselttiğini göstermektedir.

Egzersizin endotel kaynaklı NO'nun seviyesi ve biyoaktivitesi üzerine önemli etkileri vardır (Radak ve ark 2008). Antrenman nitrik oksit sentetazın indüksiyonu ile kardiyovasküler sistemde NO üretimine neden olur (Husain 2003). 3, 6 ve 12 aylık

yüzme antrenmanının sıçanlarda plazma NO seviyelerini kontrollere kıyasla artırdığı bildirilmiştir (Xiao ve Qian 2000). Sıçanlarda 8 haftalık antrenmanın plazma NO seviyelerini artırdığı gösterilmiştir (Husain 2003). Sıçanlarda akut tüketici egzersiz ile plazma nitrit/nitrat plazma değerlerinin arttığı iddia edilmiştir (Lin ve ark 2005).

Kısa süreli antrenmanın eNOS ve NO üretimini ve biyoaktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Brown 2003, Prior ve ark 2003). Uzun süreli antrenmanlardan sonra ise en azından periferik dolaşımda artan NO üretimi ve muhtemelen diğer mediatörler damarlarda yapısal değişikliklere neden olarak lümen çapının artışına yol açar (Brown 2003, Prior ve ark 2003). Bu bilgilere dayanarak, çalışmamızda kronik egzersiz yapan sıçanlarda plazma NO seviyelerinin kontrol ve akut egzersiz gruplarına kıyasla yüksek olması uyguladığımız 6 haftalık antrenman protokolünün damarlarda yapısal değişikliklere neden olacak kadar uzun ve şiddetli olmadığını düşündürmektedir.

GSE takviyesinin NO salınımı artırdığı genellikle gösterilmesine rağmen (Demrow ve ark 1995, Clifton 2004), azalttığını gösteren (Li ve ark 2001) çalışmalar da mevcuttur. Hatta tavuk embriyolarından izole edilen kardiyomiyositlerde yapılan bir hücre kültürü çalışmasında (Shao ve ark 2006), yüksek dozda GSE'nin nitrik oksit üretimini, aşırı NO üretiminin de apoptotik hücre ölümünü artırdığı iddia edilmiştir. Çalışmamızda GSE takviyesi yapılan tüm gruplarda NO seviyelerinin kontrollerine kıyasla yüksek olması GSE'nin NO salınımını artırdığını göstermektedir.

4.3.5. SOD Değişiklikleri

Akut ve kronik egzersizden sonra sıçanlarda SOD aktivitesi daha çok iskelet kası, karaciğer, kalp ve diğer dokularda incelenmiştir, plazmada egzersizle meydana gelen SOD değişiklikleri inceleyen çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Akut tek devrelik egzersizin karaciğer (Ji ve ark 1990), iskelet kası (Ji ve Fu 1992), kalp (Ji ve Mitchell 1994) ve eritrosit (Ohno ve ark 1988, Mena ve ark 1991) gibi pek çok dokuda SOD aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Birkaç istisna hariç

çalışmaların çoğunda, akut egzersizin MnSOD aktivitesinden ziyade CuZnSOD aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. SOD'nin aktivasyonunun egzersiz esnasında artan süperoksit üretimini sonucu olduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, akut egzersiz ile SOD aktivitelerinin değişmediğini (Tauler ve ark 2004) veya kalp dokusunda (Gul ve ark 2006) ve eritrositlerde (Knez ve ark 2007) azaldığını iddia eden çalışmalar da mevcuttur. Çalışmamızda akut egzersiz yapan sıçanlarda plazma SOD aktivitesi kontrollere ve kronik egzersiz yapanlara kıyasla azdı. Antioksidan enzim aktivitesinde gözlenen bu azalma enzimlerin allosterik azalmasını yansıtmaya ilaveten egzersiz esnasında artan oksidatif strese enzimlerin inaktive olmasına bağlanabilir. Elosua ve ark (2003) insanlarda 30 dakikalık bir egzersizden sonra eritrosit SOD aktivitelerinin azaldığını göstermiş ve bu durumu egzersizin yol açtığı ROS üretiminin enzim aktivitelerinin tükenmesine neden olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Biz de akut ve tüketici bir egzersiz protokolü uyguladığımızdan plazma SOD aktivitesinin dokularda, özellikle de iskelet kaslarında artan ROS üretimine bağlı olarak azalmış olabileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda kronik egzersiz yapan sıçanlarda plazma SOD aktivitesi kontrollere ve akut egzersiz yapan sıçanlara kıyasla yüksekti. Bizim bulgularımızla uyumlu olarak, dayanıklılık antrenmanı yapan sıçanların kontrollere göre % 27 daha fazla SOD aktivitesine sahip oldukları gösterilmiştir (Leeuwenburgh ve ark 1997). Düzenli antrenmanın SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırmak suretiyle oksidatif stresin zararlı etkilerini ortadan kaldırdığı gösterilmiş ve bu artışın, antioksidan enzimlerin mitokondriyal biyosentezini uyaran serbest radikal miktarındaki artışın sonucu olduğu ileri sürülmüştür (Greathouse ve ark 2005). Düzenli antrenman yapan basketbolcülerde istirahatte plazma SOD aktivitelerinin sedanterlere kıyasla yüksek olduğu gösterilmiştir (Melikoğlu ve ark 2008). Sıçanlarda iskelet kası SOD aktivitesinin antrenmanla arttığı ortaya konulmuştur (Higuchi ve ark 1985, Leewenburgh ve ark 1997, Oh-Ishi ve ark 1997). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda (Allesio ve ark 1988, Laughlin ve ark 1990, Tiidus ve ark 1996) benzer hayvan modelleri kullanılmasına rağmen SOD aktivitelerinde değişiklik bulunmamıştır. Çalışmalardaki bu farklılık, farklı SOD izoenzimlerinin çalışılmasına, farklı SOD analizlerinin kullanılmasına ve antrenman

periyodunun farklı şiddet ve sıklıkta olmasına bağlı olabilir. Sıçanlarda 8 haftalık antrenmanın plazma SOD aktivitelerini etkilemediği gösterilmiştir (Husain 2003).

Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar uyguladığımız 6 haftalık antrenmanın SOD enziminin sentezini ve ekspresyonunu uyarmak için yeterli şiddet ve sürede olduğunu göstermektedir. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda 6,5 (Husain ve Somani 1997) ve 10 (Powers ve ark 1993) haftalık treadmill antrenmanlarının SOD aktivitesini artırdığı, 12 haftalık treadmill antrenmanının ise SOD aktivitesini etkilemediği (Moran ve ark 2004) gösterilmiştir. Bu da antrenman protokolü seçiminde antrenman süresi ve şiddetinin önemli olduğunu göstermektedir.

GSE takviyesinin akut ve kronik egzersizde SOD aktiviteleri üzerine etkisini araştıran çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, GSE'nin iskemi/reperfüzyon hasarı (Sato ve ark 1999, Sehirli ve ark 2008) ve çeşitli ilaçların ve kimyasalların neden olduğu organ toksisiteleri (Bagchi ve ark 1998a, Ye ve ark 1999, Joshi ve ark 2000) sonucunda azalan SOD aktivitelerini yükselttiği gösterilmiştir. Çalışmamızda GSE takviyesi yapılan kontrol, akut egzersiz ve kronik egzersiz gruplarında SOD aktiviteleri GSE almayan kontrollerine kıyasla yüksekti. GSE takviyesi yapılan kronik egzersiz grubunun en yüksek SOD aktivitesine sahip olması ve GSE takviyesi yapılan akut egzersiz grubunda SOD aktivitelerinin kontrol grubundan farklı olmaması, GSE'nin antioksidan enzimlerin artışı yoluyla egzersizin neden olduğu oksidatif hasarı önlemede etkin olduğunu göstermektedir.

4.3.6. GPx Değişiklikleri

GPx aktivitesinde akut egzersiz ile meydana gelen değişiklikler iskelet kası (Ji ve ark 1990, Leeuwenburgh ve Ji 1998), kalp (Gul ve ark 2006) ve akciğer (Lin ve ark 2005) gibi dokularda araştırılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bununla birlikte, sıçanlarda akut egzersizle plazma GPx aktivitelerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen çalışmalar sınırlıdır. Bazı çalışmalarda (Ji ve ark 1990, Leeuwenburgh ve Ji 1998) akut egzersizle iskelet kasında bu enzimin aktivitesinin değişmediği, bazı

çalışmalarda (Ji ve Fu 1992, Oh-ishi ve ark 1996) ise yükseldiği gösterilmiştir. Kalp dokusunda ise akut egzersizden sonra GPx aktivitesinin arttığını da (Quintanilha ve ark 1984) azaldığını da (Gul ve ark 2006) gösteren çalışmalar vardır. Lin ve ark (2005) sıçanlarda akut tüketici egzersizden sonra akciğer dokusunda GPx aktivitelerinin arttığını göstermişlerdir. Marzatico ve ark (1997) insanlarda sprint egzersizinden sonra eritrosit GPx aktivitesinin arttığını ortaya koymuşlardır. Ortenblad ve ark (1997) aralarında 2 dakikalık dinlenme dönemleri bulunan 30 saniye süreli 6 zorlu zıplama egzersizi ile GPx aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Bu sonuçların aksine, Wingate testinin GPx aktivitesini etkilemediği iddia edilmiştir (Groussard ve ark 2003a). Bizim çalışmamızda da plazma GPx aktiviteleri GSE takviyesi yapılmayan akut egzersiz grubunda kontrol grubuna kıyasla azalmasına rağmen GSE takviyesi yapılan akut egzersiz grubunda GSE takviyesi yapılan kontrol grubundan farklı değildi. Genel kabul gören görüş akut egzersiz sonucunda plazma GPx aktivitelerinin arttığı veya değişmediği yönünde olmasına rağmen azaldığını gösteren çalışmalar (Knez ve ark 2007, Gul ve ark 2006) da mevcuttur. Antioksidan enzim aktivitesinde gözlenen azalma enzimlerin allosterik azalmasına ve egzersiz esnasında büyük miktarlara ulaşan oksidatif strese enzimlerin inaktive olmasına bağlanabilir. Elosua ve ark (2003) insanlarda 30 dakikalık bir egzersizden sonra kan GPx ve glutatyon redüktaz aktivitelerinin azaldığını göstermiş ve bu durumu egzersizin yol açtığı ROS üretiminin enzim aktivitelerinin tükenmesine neden olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Çalışmamızda akut ve tüketici bir egzersiz protokolü uyguladığımızdan plazma GPx aktivitesinin dokularda, özellikle iskelet kaslarında artan ROS üretimine bağlı olarak azalmış olabileceğini düşünüyoruz.

Düzenli antrenmanın GPx aktivitelerini iskelet kasında ve plazmada artırdığı gösterilmiştir (Sen ve ark 1992, Oh-ishi ve ark 1997). Leeuwenburgh ve ark (1994) 10 haftalık antrenmanın vastus lateralis kasında GPx aktivitesini artırdığını göstermişlerdir. Dayanıklılık antrenmanı yapan sıçanlarda bu kasın glutatyon içeriğinde % 33 artış gözlenmiş ve antrenmanlı sıçanların kontrollere kıyasla % 62 daha fazla GPx aktivitesine sahip oldukları gösterilmiştir (Leeuwenburgh ve ark 1997). Bu sonuçlara benzer şekilde, sıçanlarda 8 haftalık antrenmanın plazma GPx aktivitelerini kontrollere kıyasla yükselttiği bulunmuştur (Husain 2003). Düzenli antrenman yapan

basketbolcularda ve antrenmanlı bireylerde istirahat plazma ve eritrosit GPx aktivitelerinin sedanterlere kıyasla yüksek olduğu gösterilmiştir (Marzatico ve ark 1997, Melikoğlu ve ark 2008). Çalışmamızda plazma GPx aktivitesi kronik egzersiz yapan sıçanlarda kontrollere ve akut egzersiz yapan sıçanlara kıyasla yükselmiştir. Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar uyguladığımız 6 haftalık antrenmanın GPx enziminin sentezini uyarmak için yeterli şiddet ve sürede olduğunu göstermektedir.

Yukarıda da belirttiğimiz gibi, GSE'nin akut ve kronik egzersiz üzerine etkisini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, GSE'nin iskemi/reperfüzyon hasarı ve çeşitli ilaçların neden olduğu organ toksisiteleri sonucunda azalan GPx aktivitesini yükselttiği gösterilmiştir (Karthikeyan ve ark 2007). Bizim çalışmamızda da GSE takviyesi yapılan kontrol, akut egzersiz ve kronik egzersiz gruplarında GPx aktiviteleri GSE almayan kontrollerine kıyasla yüksekti. GSE takviyesi yapılan kronik egzersiz grubunun en yüksek GPx aktivitesine sahip olması ve GSE takviyesi yapılan akut egzersiz grubunda GPx aktivitesinin GSE takviyesi yapılan ve yapılmayan kontrol gruplarından farklı olmaması GSE'nin akut egzersizin neden olduğu oksidatif hasarı önlemede etkili olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Akut ve kronik egzersiz yaptırılan sıçanlarda GSE takviyesinin vücut ağırlığı değişimi, egzersiz performansı ve çeşitli oksidatif stres ve antioksidan savunma belirteçleri üzerine etkilerini araştırmayı amaçladığımız bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlara göre;

1. GSE takviyesi antrenman yapan sıçanlarda vücut ağırlığı artışına neden olurken, antrenmansız sıçanlarda vücut ağırlığı üzerine etkisi yoktur.

2. GSE takviyesinin antrenmansız sıçanlarda tükeninceye kadar yaptırılan akut egzersizin süresi üzerine etkisi yoktur. Ancak GSE'nin egzersiz performansı üzerine etkisinin daha ayrıntılı olarak araştırılması gereklidir.

3. Sıçanlarda akut egzersiz (plazma MDA seviyelerindeki artış ile gösterilen) lipid peroksidasyonunu artırırken, kronik egzersiz lipid peroksidasyonu seviyelerini kontrollerin de altına indirmiştir. Bu da düzenli egzersizin oksidatif hasarı önlemede yararlı olduğunu göstermektedir.

4. GSE takviyesi, hem istirahatteki hem de akut ve kronik egzersiz yapan sıçanlarda plazma MDA düzeylerini azaltarak lipid peroksidasyonunu azaltmıştır. Bu da GSE'nin güçlü bir antioksidan olduğunu göstermektedir. Ancak, bu çalışmamız GSE'nin egzersizin neden olduğu oksidatif hasar üzerine etkisi araştıran ilk çalışma olduğundan bu konuda daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gereklidir.

5. Plazma XO ve ADA aktiviteleri akut egzersiz ile önemli ölçüde yükselirken, 6 haftalık antrenman sonucunda herhangi bir değişiklik olmamıştır. GSE takviyesi akut egzersiz sonucunda yükselen XO ve ADA aktivitelerini azaltarak kontrol seviyelerine yaklaştırmıştır.

6. Plazma NO seviyesi antrenmana cevaben artarken akut egzersizde herhangi bir değişiklik olmamıştır. GSE takviyesi de plazma NO seviyesini yükseltmektedir.

7. Plazma SOD ve GPx aktiviteleri akut egzersiz ile azalırken, antrenmanla yükselmiştir. GSE takviyesinin akut egzersizde SOD ve GPx aktiviteleri üzerine etkisi ise sınırlıdır, ancak bu konu hakkında daha ayrıntılı bilgi için iskelet kası SOD ve GPx aktivitelerinin araştırılması gerekmektedir. GSE takviyesinin 6 haftalık kronik egzersizde SOD ve GPx aktiviteleri üzerine etkisi bu enzimlerin aktivitelerini artırarak kronik egzersizin etkisini destekler yöndedir.

8. Akut egzersiz yapan kontrol grubunun en yüksek MDA, ADA, XO ve en düşük SOD ve GPx aktivitelerine sahip olması ve GSE takviyesi yapılan kronik egzersiz grubunun da en düşük MDA ve en yüksek SOD, GPx ve NO seviyelerine sahip olması düzenli antrenmanın ve GSE takviyesinin oksidatif stres ve antioksidan savunma üzerine olumlu etkilerine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, sıçanlarda akut egzersiz oksidatif strese ve sonuçta lipid peroksidasyonuna ve iskemi benzeri durumlara neden olurken, yeterli şiddet ve sürede yapılan antrenmanlar antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarak antioksidan savunmayı güçlendirmektedir. Üzüm çekirdeği ekstresi güçlü bir antioksidan etkinliğe sahiptir ve egzersizin neden olduğu oksidatif hasarı da azaltmaktadır. Çalışmamız bu konuda yapılan ilk araştırma olduğundan üzüm çekirdeği ekstresinin farklı etki mekanizmaları ile ilgili detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Sıçanlarda Akut ve Kronik Egzersizin Neden Olduğu Oksidatif Hasar ve Antioksidan Savunma Üzerine Etkileri

Muaz Belviranlı

Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2009

Çalışmanın amacı akut ve kronik egzersiz yaptırılan sıçanlarda üzüm çekirdeği ekstresi (GSE) takviyesinin vücut ağırlığı, egzersiz performansı ve çeşitli oksidatif stres ve antioksidan savunma belirteçleri üzerine etkilerini araştırmaktır.

Çalışmanın başlangıcında ağırlıkları 200-300 g arasında ve yaklaşık 14 haftalık olan 64 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar rasgele seçilmek suretiyle 6 gruba ayrıldı ve gruplar şu şekilde oluşturuldu: Kontrol Grubu (C), Kontrol Kronik Egzersiz Grubu (CCE), Kontrol Akut Egzersiz Grubu (CAE), GSE Kontrol Grubu (GC), GSE Kronik Egzersiz Grubu (GCE), GSE Akut Egzersiz Grubu (GAE). Kronik egzersiz gruplarındaki hayvanlara 6 hafta boyunca haftada 5 gün, 25 m/dk hızda 45 dakika koşu bandında egzersiz yaptırıldı. Akut egzersiz gruplarındaki hayvanlara ise 30 m/dk hızda tükeninceye kadar egzersiz yaptırıldı. GC, GCE ve GAE gruplarında bulunan sıçanlara günlük 100 mg/kg GSE, içme suyuna karıştırılmak suretiyle 6 hafta boyunca uygulandı. Çalışmanın sonunda akut egzersiz gruplarındaki sıçanlardan egzersizden hemen sonra, kronik egzersiz gruplarındaki sıçanlardan ise son egzersizden 24 saat sonra kan örnekleri alındı. Kan örneklerinden ayrılan plazmada malondialdehit (MDA), ksantin oksidaz (XO), adenozin deaminaz (ADA), nitrik oksit (NO), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) tayinleri yapıldı.

Vücut ağırlığı artışı GAE grubunda C ve CCE gruplarına kıyasla, GCE grubunda ise CCE grubuna kıyasla daha yüksekti. Tükenme süreleri bakımından akut egzersiz grupları arasında fark yoktu. Plazma MDA seviyeleri kontrollerine kıyasla akut egzersiz yapan sıçanlarda daha yüksek, kronik egzersiz yapan sıçanlarda daha düşük idi. GSE takviyesi yapılan gruplarda MDA seviyeleri kontrollerine kıyasla daha düşük idi. XO ve ADA aktiviteleri CAE grubunda tüm gruplardan yüksekti ve diğer gruplar arasında herhangi bir fark yoktu. NO seviyeleri kronik egzersiz ve GSE takviyesi ile yükselirken akut egzersiz yapan sıçanlarda kontrollerinden farklı değildi. SOD ve GPx aktiviteleri, kontrollerine kıyasla akut egzersiz ile azalırken kronik egzersiz ile yükselmişti. GSE takviyesi yapılan gruplarda antioksidan enzim aktiviteleri kontrollerine kıyasla daha yüksek idi.

Çalışmanın sonucunda elde ettiğimiz bulgular, oksidatif stresin akut egzersiz ile artarken kronik egzersiz ile azaldığını, antioksidan enzimlerin akut egzersiz ile azalırken, kronik egzersiz ile arttığını göstermektedir. GSE takviyesi ise lipid peroksidasyonunu önlemek ve antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırmak suretiyle egzersizin neden olduğu oksidatif stresi önlemektedir.

Anahtar Sözcükler: Üzüm çekirdeği ekstresi, egzersiz, oksidatif stres, antioksidan enzim

7. SUMMARY

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Effects of Grape Seed Extract on Oxidative Damage and Antioxidant Defense Induced by Acute and Chronic Exercise in Rats

Muaz Belviranlı

Physiology (Medicine)

PhD Thesis / KONYA–2009

The aim of the present study was to investigate the effects of grape seed extract (GSE) on body weight, exercise performance and several oxidative stress and antioxidant defense markers in acutely and chronically exercised rats.

Sixty-four male rats aged 14 weeks, weighing 200-300 g at the beginning of the experiment were used. Rats were assigned randomly to six groups: Control (C), Control Chronic Exercise (CCE), Control Acute Exercise (CAE), GSE-supplemented Control (GC), GSE-supplemented Chronic Exercise (GCE) and GSE-supplemented Acute Exercise (GAE) groups. Chronic exercise consisted of treadmill running at 25 m.min⁻¹ 45 min.day⁻¹, 5 days a week for 6 weeks. Rats in the acute exercise groups were run on the treadmill at 30 m.min⁻¹ until exhaustion. Rats in groups GC, GCE and GAE received GSE at 100 mg.kg⁻¹ of body weight with drinking water for 6 weeks. Blood samples were collected in acute exercise groups immediately after exercise and in chronic exercise groups 24 h after the last exercise. Plasma were separated from blood for the analysis of malondialdehyde (MDA), xanthine oxidase (XO), adenosine deaminase (ADA), nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx).

Body weight changes were significantly higher in GAE group compared to the C and CCE groups and GCE group compared to the CCE group. There were no significant differences in time of exhaustion between the acute exercise groups. Plasma MDA levels were significantly higher in acute exercise groups and significantly lower in chronic exercise groups compared to the controls. MDA levels were significantly lower in GSE-supplemented groups compared to their controls. XO and ADA activities were significantly higher in CAE group compared to the all other groups and there were no significant differences between the other groups. Although NO levels were significantly increased with chronic exercise and GSE supplementation, it was not different in acute exercise groups compared to the controls. SOD and GPx activities were significantly lower in acute exercise group and significantly higher in chronic exercise group compared to their controls. Antioxidant enzyme activities were significantly higher in GSE-supplemented groups compared to the controls.

Results of the present study demonstrated that oxidative stress are elevated with acute exercise and attenuated with chronic exercise and antioxidant enzyme activities are decreased with acute exercise and increased with chronic exercise. GSE supplementation prevents exercise-induced oxidative stress by preventing lipid peroxidation and increasing the antioxidant enzyme activities.

Key words: Grape seed extract, exercise, oxidative stress, antioxidant enzyme

8. KAYNAKLAR

1. Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 1989;38:1763-9.
2. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Cordova A, Pons A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav.* 2005;84:1-7.
3. Aksoy Y, Yapanoğlu T, Aksoy H, Demircan B, Oztaşan N, Canakçi E, Malkoç I. Effects of endurance training on antioxidant defense mechanisms and lipid peroxidation in testis of rats. *Arch Androl.* 2006;52:319-23.
4. Alessio HM, Goldfarb AH, Cutler RG. MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am J Physiol.* 1988;255:874-7.
5. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25:218-24.
6. Alessio HM, Goldfarb AH, Cao G. Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. *Int J Sport Nutr.* 1997;7:1-9.
7. Alessio HM, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32:1576-81.
8. Alessio HM, Hagerman AE, Romanello M, Carando S, Threlkeld MS, Rogers J, Dimitrova Y, Subiquah M, Wiley RL. Consumption of green tea protects rats from exercise-induced oxidative stress in kidney and liver. *Nutr Res.* 2002;22:1177-88.
9. Alessio HM, Hagerman AE, Nagy S, Philip B, Byrnes RN, Woodward JL, Callahan P, Wiley RL. Exercise improves biomarkers of health and stress in animals fed ad libitum. *Physiol Behav.* 2005;84:65-72.
10. Andrade FH, Reid MB, Allen DG, Westerblad H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J Physiol.* 1998;509:565-75.
11. Antunes F, Han D, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1260-7.
12. Antunes-Neto JM, Toyama MH, Carneiro EM, Boschero AC, Pereira-da-Silva L, Macedo DV. Circulating leukocyte heat shock protein 70 (HSP70) and oxidative stress markers in rats after a bout of exhaustive exercise. *Stress.* 2006;9:107-15.
13. Ardévol A, Bladé C, Salvadó MJ, Arola L. Changes in lipolysis and hormone-sensitive lipase expression caused by procyanidins in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24:319-24.
14. Ariga T. The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins. *Biofactors.* 2004;21:197-201.
15. Arosio P, Levi S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:457-63.
16. Aruoma OI, Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr.* 1999;8:53-63.

17. Ashton T, Rowlands CC, Jones E, Young IS, Jackson SK, Davies B, Peters JR. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1998;77:498-502.
18. Ashton T, Young IS, Peters JR, Jones E, Jackson SK, Davies B, Rowlands CC. Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J Appl Physiol*. 1999;87:2032-6.
19. Aviram M, Fuhrman B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;957:146-61.
20. Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J. Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in rats. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:142-8.
21. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX, Stohs SJ. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1997;95:179-89.
22. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Bagchi DJ, Balmoori J, Stohs SJ. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen Pharmacol*. 1998a;30:771-6.
23. Bagchi D, Kuszynski C, Balmoori J, Bagchi M, Stohs SJ. Hydrogen peroxide-induced modulation of intracellular oxidized states in cultured macrophage J774A.1 and neuroactive PC-12 cells, and protection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Phytother Res*. 1998b;12:568-71.
24. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 2000;148:187-97.
25. Bagchi D, Ray SD, Patel D, Bagchi M. Protection against drug- and chemical-induced multiorgan toxicity by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Drugs Exp Clin Res*. 2001;27:3-15.
26. Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, Ray SD, Sen CK, Preuss HG. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;957:260-70.
27. Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, Vinson JA. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat Res*. 2003;523-524:87-97.
28. Bagchi M, Balmoori J, Bagchi D, Ray SD, Kuszynski C, Stohs SJ. Smokeless tobacco, oxidative stress, apoptosis, and antioxidants in human oral keratinocytes. *Free Radic Biol Med*. 1999a;26:992-1000.
29. Bagchi M, Milnes M, Williams C, Balmoori J, Ye X, Stohs S, Bagchi D. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal injury in rats, and the protective ability of a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Nutr Res*. 1999b;19:1189-99.
30. Balu M, Sangeetha P, Haripriya D, Panneerselvam C. Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. *Neurosci Lett*. 2005a;383:295-300.
31. 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*. 2005b;23:501-7.
32. Balu M, Sangeetha P, Murali G, Panneerselvam C. Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. *Brain Res Bull*. 2006;68:469-73.

33. Banerjee AK, Mandal A, Chanda D, Chakraborti S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol Cell Biochem.* 2003;253:307-12.
34. Banerjee B, Bagchi D Beneficial effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract in the treatment of chronic pancreatitis. *Digestion* 2001;63:203-6.
35. Bassini-Cameron A, Sweet E, Bottino A, Bittar C, Veiga C, Cameron LC. Effect of caffeine supplementation on haematological and biochemical variables in elite soccer players under physical stress conditions. *Br J Sports Med.* 2007;41:523-30.
36. Baydar NG, Özkan G, Yaşar S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control.* 2007;18:1131-6.
37. Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med.* 1993;14:615-31.
38. Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem.* 1997;272:19633-6.
39. Beecher GR. Proanthocyanidins: Biological Activities Associated with Human Health. *Pharmaceutical Biology.* 2004;42:2-20.
40. Bejma J, Ji LL. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1999;87:465-70.
41. Belleville J. The French paradox: possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. *Nutrition.* 2002;18:173-7.
42. Bentivegna SS, Whitney KM. Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. *Food Chem Toxicol.* 2002;40:1731-43.
43. Bernátová I, Pechánová O, Babál P, Kyselá S, Stvrtina S, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:942-8.
44. Bloomer RJ, Goldfarb AH. Anaerobic exercise and oxidative stress: A review. *Can J Appl Physiol.* 2004;29:245-63.
45. Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ, Consitt LA. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res.* 2005;19:276-85.
46. Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH. Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gend Med.* 2008;5:218-28.
47. Bors W, Michel C, Stettmaier K. Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. *Arch Biochem Biophys.* 2000;374:347-55.
48. Boveris A, Navarro A. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:224-9.
49. Brantley RE Jr, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, Singleton EW, Olson JS. The mechanism of autooxidation of myoglobin. *J Biol Chem.* 1993;268:6995-7010.
50. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998;56:317-33.
51. Brites FD, Evelson PA, Christiansen MG, Nicol MF, Basílico MJ, Wikinski RW, Llesuy SF. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin Sci (Lond).* 1999;96:381-5.
52. Brown MD. Exercise and coronary vascular remodelling in the healthy heart. *Exp Physiol.* 2003;88:645-58.

53. Camus G, Felekidis A, Pincemail J, Deby-Dupont G, Deby C, Juchmes-Ferir A, Lejeune R, Lamy M. Blood levels of reduced/oxidized glutathione and plasma concentration of ascorbic acid during eccentric and concentric exercises of similar energy cost. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*. 1994;102:67-70.
54. Cazzola R, Russo-Volpe S, Cervato G, Cestaro B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur J Clin Invest*. 2003;33:924-30.
55. Chang CK, Tseng HF, Hsuw YD, Chan WH, Shieh LC. Higher LDL oxidation at rest and after a rugby game in weekend warriors. *Ann Nutr Metab*. 2002;46:103-7.
56. Chang WT, Shao ZH, Vanden Hoek TL, McEntee E, Mehendale SR, Li J, Becker LB, Yuan CS. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidins, baicalin and wogonin: comparison between acute and chronic treatments. *Am J Chin Med*. 2006;34:363-5.
57. Chen SS, Chang LS, Wei YH. Oxidative damage to proteins and decrease of antioxidant capacity in patients with varicocele. *Free Radic Biol Med*. 2001;30:1328-34.
58. Chen ZY, Chan PT, Ho KY, Fung KP, Wang J. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem Phys Lipids*. 1996;79:157-63.
59. Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berenshtein E, Stadtman ER, Epstein Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:5119-23.
60. Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL, Donnelly AE. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc*. 1998;30:1603-7.
61. Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL. Resting serum antioxidant status is positively correlated with peak oxygen uptake in endurance trained runners. *J Sports Med Phys Fitness*. 1999;39:282-4.
62. Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med*. 2001;31:745-53.
63. Clarkson PM. Antioxidants and physical performance. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1995;35:131-41.
64. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*. 2000;72:637S-46S.
65. Clifton PM. Effect of Grape Seed Extract and Quercetin on Cardiovascular and Endothelial Parameters in High-Risk Subjects. *J Biomed Biotechnol*. 2004;2004:272-8.
66. Cooke M, Iosia M, Buford T, Shelmadine B, Hudson G, Kerksick C, Rasmussen C, Greenwood M, Leutholtz B, Willoughby D, Kreider R. Effects of acute and 14-day coenzyme Q10 supplementation on exercise performance in both trained and untrained individuals. *J Int Soc Sports Nutr*. 2008;5:8.
67. Coombes JS, Powers SK, Rowell B, Hamilton KL, Dodd SL, Shanely RA, Sen CK, Packer L. Effects of vitamin E and alpha-lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. *J Appl Physiol*. 2001;90:1424-30.
68. Coombes JS, Rowell B, Dodd SL, Demirel HA, Naito H, Shanely RA, Powers SK. Effects of vitamin E deficiency on fatigue and muscle contractile properties. *Eur J Appl Physiol*. 2002;87:272-7.
69. Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2002;30:280-5.

70. Cos P, De Bruyne T, Hermans N, Apers S, Berghe DV, Vlietinck AJ. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr Med Chem*. 2004;11:1345-59.
71. Coskun S, Gonul B, Guzel NA, Balabanli B. The effects of vitamin C supplementation on oxidative stress and antioxidant content in the brains of chronically exercised rats. *Mol Cell Biochem*. 2005;280:135-8.
72. Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr*. 2001;20:591-8.
73. Criswell D, Powers S, Dodd S, Lawler J, Edwards W, Renshler K, Grinton S. High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc*. 1993;25:1135-40.
74. Cutler RG, Plummer J, Chowdhury K, Heward C. Oxidative Stress Profiling: Part II. Theory, Technology, and Practice. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1055:136-58.
75. Da Silva EL, Piskula M, Terao J. Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. *Free Radic Biol Med*. 1998;24:1209-16.
76. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise *Biochem Biophys Res Commun*. 1982;107:1198-205.
77. Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J*. 1986;235:747-54.
78. Dawson B, Henry GJ, Goodman C, Gillam I, Beilby JR, Ching S, Fabian V, Dasig D, Morling P, Kakulus BA. Effect of Vitamin C and E supplementation on biochemical and ultrastructural indices of muscle damage after a 21 km run. *Int J Sports Med*. 2002;23:10-5.
79. De Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J Agric Food Chem*. 2000;48:5331-7.
80. Deaton CM, Marlin DJ. Exercise-associated oxidative stress. *Clin Tech Equine Prac*. 2003;2:278-91.
81. Dekkers JC, van Doornen LJ, Kemper HC. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med*. 1996;21:213-38.
82. Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J, Naito H. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol*. 2001;91:2205-12.
83. Demrow HS, Slane PR, Folts JD. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation*. 1995;91:1182-8.
84. Déprez S, Brezillon C, Rabot S, Philippe C, Mila I, Lapierre C, Scalbert A. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J Nutr*. 2000;130:2733-8.
85. Deprez S, Mila I, Huneau JF, Tome D, Scalbert A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid Redox Signal*. 2001;3:957-67.
86. Deshane J, Chaves L, Sarikonda KV, Isbell S, Wilson L, Kirk M, Grubbs C, Barnes S, Meleth S, Kim H. Proteomics analysis of rat brain protein modulations by grape seed extract. *J Agric Food Chem*. 2004;52:7872-83.
87. Devi A, Jolitha AB, Ishii N. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) and antioxidant defense in the brain of adult rats. *Med Sci Monit*. 2006;12:124-9.

88. Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept.* 2001;10:125-40.
89. Diebolt M, Bucher B, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension.* 2001;38:159-65.
90. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol.* 1978;45:927-32.
91. Dixon CB, Robertson RJ, Goss FL, Timmer JM, Nagle E, Evans RW. Effect of resistance training status on free radical production and muscle damage following acute exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2003;35:157.
92. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med.* 2002;32:1102-15.
93. Donovan JL, Bell JR, Kasim-Karakas S, German JB, Walzem RL, Hansen RJ, Waterhouse AL. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J Nutr.* 1999;129:1662-8.
94. Donovan JL, Manach C, Rios L, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grape seed extract or the procyanidin dimer B3. *Br J Nutr.* 2002;87:299-306.
95. Dulundu E, Ozel Y, Topaloglu U, Toklu H, Ercan F, Gedik N, Sener G. Grape seed extract reduces oxidative stress and fibrosis in experimental biliary obstruction. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22:885-92.
96. Duthie GG. Determination of activity of antioxidants in human subjects. *Proc Nutr Soc.* 1999;58:1015-24.
97. El-Alfy AT, Ahmed AA, Fatani AJ. Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. *Pharmacol Res.* 2005;52:264-70.
98. El-Ashmawy IM, El-Nahas AF, Salama OM. Grape seed extract prevents gentamicin-induced nephrotoxicity and genotoxicity in bone marrow cells of mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006;99:230-6.
99. Elokda AS, Nielsen DH. Effects of exercise training on the glutathione antioxidant system. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2007;14:630-7.
100. Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, Ordoñez-Llanos J, Marrugat J. Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis.* 2003;167:327-34.
101. Enginar H, Cemek M, Karaca T, Unak P. Effect of grape seed extract on lipid peroxidation, antioxidant activity and peripheral blood lymphocytes in rats exposed to x-radiation. *Phytother Res.* 2007;21:1029-35.
102. Eraslan G, Saygı S, Essiz D, Aksoy A, Gul H, Macit E. Evaluation of aspect of some oxidative stress parameters using vitamin E, proanthocyanidin and *N*-acetylcysteine against exposure to cyfluthrin in mice. *Pest Biochem Physiol.* 2007;88:43-9.
103. Erkiliç K, Evereklioglu C, Cekmen M, Ozkiris A, Duygulu F, Dogan H. Adenosine deaminase enzyme activity is increased and negatively correlates with catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in patients with Behçet's disease: original contributions/clinical and laboratory investigations. *Mediators Inflamm.* 2003;12:107-16.
104. Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:647-52.

105. Evelson P, Gambino G, Travacio M, Jaita G, Verona J, Maroncelli C, Wikinski R, Llesuy S, Brites F. Higher antioxidant defences in plasma and low density lipoproteins from rugby players. *Eur J Clin Invest.* 2002;32:818-25.
106. Fan P, Lou H. Effects of polyphenols from grape seeds on oxidative damage to cellular DNA. *Mol Cell Biochem.* 2004;267:67-74.
107. Fehrenbach E, Northoff H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev.* 2001;7:66-89.
108. Feng Y, Liu YM, Fratkins JD, LeBlanc MH. Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res Bull.* 2005;66:120-7.
109. Feng Y, Liu YM, Leblanc MH, Bhatt AJ, Rhodes PG. Grape seed extract given three hours after injury suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res.* 2007;61:295-300.
110. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 2006;36:327-58.
111. Fitzpatrick DF, Fleming RC, Bing B, Maggi DA, O'Malley RM. Isolation and characterization of endothelium-dependent vasorelaxing compounds from grape seeds. *J Agric Food Chem.* 2000;48:6384-90.
112. Frank J, Pompella A, Biesalski HK. Histochemical visualization of oxidant stress. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:1096-105.
113. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet.* 1993;341:454-7.
114. Frederiks WM, Bosch KS. The role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion damage of rat liver. *Histol Histopathol.* 1995;10:111-6.
115. Freedman JE, Parker C 3rd, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, Deak LR, Iafrati MD, Folts JD. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation.* 2001;103:2792-8.
116. Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr.* 1995;61:549-54.
117. Fujii H, Yokozawa T, Kim YA, Tohda C, Nonaka G. Protective effect of grape seed polyphenols against high glucose-induced oxidative stress. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70:2104-11.
118. Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr.* 2002;75:880-6.
119. Genova ML, Pich MM, Bernacchia A, Bianchi C, Biondi A, Bovina C, Falasca AI, Formiggini G, Castelli GP, Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1011:86-100.
120. Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem.* 2002 Mar;383:375-88.
121. Giusti G. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer MV, editor. *Methods of enzymatic analysis.* 2nd ed. New York: Academic Press; 1974. p. 1092-8.
122. Gohil K, Rothfuss L, Lang J, Packer L. Effect of exercise training on tissue vitamin E and ubiquinone content. *J Appl Physiol.* 1987;63:1638-41.

123. Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell*. 2002;1:117-23.
124. Goldfarb AH, McIntosh MK, Boyer BT, Fatouros J. Vitamin E effects on indexes of lipid peroxidation in muscle from DHEA-treated and exercised rats. *J Appl Physiol*. 1994;76:1630-5.
125. Goldfarb AH. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol*. 1999;24:249-66.
126. Goldfarb AH, Bloomer RJ, McKenzie MJ. Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2005;37:234-9.
127. Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardó FV, Sastre J, Ji LL, Viña J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*. 2005;567:113-20.
128. González B, Manso R. Induction, modification and accumulation of HSP70s in the rat liver after acute exercise: early and late responses. *J Physiol*. 2004;556:369-85.
129. Greathouse KL, Samuels M, Dimarco NM, Criswell DS. Effects of increased dietary fat and exercise on skeletal muscle lipid peroxidation and antioxidant capacity in male rats. *Eur J Nutr*. 2005;44:429-35.
130. Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, Chevanne M, Vincent S, Sergent O, Cillard J, Gratas-Delamarche A. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2003a;89:14-20.
131. Groussard C, Machefer G, Rannou F, Faure H, Zouhal H, Sergent O, Chevanne M, Cillard J, Gratas-Delamarche A. Physical fitness and plasma non-enzymatic antioxidant status at rest and after a wingate test. *Can J Appl Physiol*. 2003b;28:79-92.
132. Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, Prior RL. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr*. 2004;134:613-7.
133. Gul M, Laaksonen DE, Atalay M, Vider L, Hänninen O. Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Scand J Med Sci Sports*. 2002;12:163-70.
134. Gul M, Demircan B, Taysi S, Oztasan N, Gumustekin K, Siktar E, Polat MF, Akar S, Akcay F, Dane S. Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2006;143:239-45.
135. Gunther MR, Sampath V, Caughey WS. Potential roles of myoglobin autoxidation in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:1388-95.
136. Gül M, Öztaşan N, Taysi S, Gümüştekin K, Akar S, Bakan N, Dane Ş. Sıçanlarda oksidatif stress modeli olarak kısa süreli yüzme egzersizi. *Hacettepe Üni. Spor. Bil. Derg*. 2001;12 26-32.
137. Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *J. Agric. Food Chem*. 1998, 46:1887-92.
138. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*. 1992;119:598-620.
139. Halliwell B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutr Rev*. 1999;57:104-13.

140. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press New York, 2000;534-7.
141. Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radic Res*. 2000;33:819-30.
142. Hamilton KL, Staib JL, Phillips T, Hess A, Lennon SL, Powers SK. Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*. 2003;34:800-9.
143. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998;92:3007-17.
144. Harris MB, Mitchell BM, Sood SG, Webb RC, Venema RC. Increased nitric oxide synthase activity and Hsp90 association in skeletal muscle following chronic exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2008;104:795-802
145. Hellsten-Westing Y, Kaijser L, Ekblom B, Sjödín B. Exchange of purines in human liver and skeletal muscle with short-term exhaustive exercise. *Am J Physiol*. 1994;266:81-6.
146. Hellsten Y, Apple FS, Sjodin B. Effect of sprint cycle training on activities of antioxidant enzymes in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1996;81:1484-7.
147. Hellsten Y, Sjödín B, Richter EA, Bangsbo J. Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *Am J Physiol*. 1998;274:600-6.
148. Hellsten Y, Svensson M, Sjödín B, Smith S, Christensen A, Richter EA, Bangsbo J. Allantoin formation and urate and glutathione exchange in human muscle during submaximal exercise. *Free Radic Biol Med*. 2001;31:1313-22.
149. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993;342:1007-11.
150. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr Cancer*. 1994;22:175-84.
151. Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*. 1995;155:381-6.
152. Hertog MG, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr*. 1997;65:1489-94.
153. Heunks LM, Viña J, van Herwaarden CL, Folgering HT, Gimeno A, Dekhuijzen PN. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol*. 1999;277:1697-704.
154. Higuchi M, Cartier LJ, Chen M, Holloszy JO. Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. *J Gerontol*. 1985;40:281-6.
155. Hollander J, Fiebig R, Gore M, Bejma J, Ookawara T, Ohno H, Ji LL. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training. *Am J Physiol*. 1999;277:856-62.
156. Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:798-804.

157. Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, Koprowski H. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:675-80.
158. Hooper DC, Scott GS, Zborek A, Mikheeva T, Kean RB, Koprowski H, Spitsin SV. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J*. 2000;14:691-8.
159. Husain K, Somani SM. Response of cardiac antioxidant system to alcohol and exercise training in the rat. *Alcohol*. 1997;14:301-7.
160. Husain K. Interaction of exercise training and chronic NOS inhibition on blood pressure, heart rate, NO and antioxidants in plasma of rats. *Pathophysiology*. 2003;10:47-56.
161. Ide T, Tsutsui H, Ohashi N, Hayashidani S, Suematsu N, Tsuchihashi M, Tamai H, Takeshita A. Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:438-42.
162. Igarashi O, Yonekawa Y, Fujiyama-Fujihara Y. Synergistic action of vitamin E and vitamin C in vivo using a new mutant of Wistar-strain rats, ODS, unable to synthesize vitamin C. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1991;37:359-69.
163. Ilhan N, Kamanli A, Ozmerdivenli R, Ilhan N. Variable effects of exercise intensity on reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive substance levels, and glucose concentration. *Arch Med Res*. 2004;35:294-300.
164. Inal M, Akyüz F, Turgut A, Getsfrid WM. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33:564-7.
165. Iwasaki Y, Matsui T, Arakawa Y. The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in Wistar rats. *J Gastroenterol*. 2004;39:831-7.
166. Jackson MJ, Edwards RH, Symons MC. Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 1985;847:185-90.
167. Jackson MJ, O'Farrell S. Free radicals and muscle damage. *Br Med Bull*. 1993;49:630-41.
168. Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med*. 1988;5:156-70.
169. Jenkins RR, Goldfarb A. Introduction: oxidant stress, aging, and exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 1993;25:210-2.
170. Jenkins RR. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:670-4.
171. Ji LL, Dillon D, Wu E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol*. 1990;258:918-23.
172. Ji LL, Fu R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol*. 1992;72:549-54.
173. Ji LL, Mitchell EW. Effects of Adriamycin on heart mitochondrial function in rested and exercised rats. *Biochem Pharmacol*. 1994;47:877-85.
174. Ji LL. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med*. 1995;18:1079-86.
175. Ji LL. Exercise at old age: Does it increase or alleviate oxidative stress? *Ann N Y Acad Sci*. 2001;928:236-47.
176. Ji LL. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;959:82-92.

177. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1067:425-35.
178. Joshi SS, Kuszynski CA, Bagchi M, Bagchi D. Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidin extract on Chang liver cells. *Toxicology.* 2000;155:83-90.
179. Joshi SS, Kuszynski CA, Bagchi D. The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract. *Curr Pharm Biotechnol.* 2001;2:187-200.
180. Kalfin R, Righi A, Del Rosso A, Bagchi D, Generini S, Cerinic MM, Das DK. Activin, a grape seed-derived proanthocyanidin extract, reduces plasma levels of oxidative stress and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin) in systemic sclerosis. *Free Radic Res.* 2002;36:819-25.
181. Kanter MM, Nolte LA, Holloszy JO. Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J Appl Physiol.* 1993;74:965-9.
182. Kanter MM. Free radicals, exercise, and antioxidant supplementation. *Int J Sport Nutr.* 1994;4:205-20.
183. Kar P, Laight D, Shaw KM, Cummings MH. Flavonoid-rich grape seed extracts: A new approach in high cardiovascular risk patients? *Int J Clin Pract.* 2006;60:1484-92.
184. Karanth J, Kumar R, Jeevaratnam K. Response of antioxidant system in rats to dietary fat and physical activity *Indian J Physiol Pharmacol* 2004;48:446-52.
185. Karthikeyan K, Bai BR, Devaraj SN. Cardioprotective effect of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *Int J Cardiol.* 2007;115:326-33.
186. Kasai H. Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:450-6.
187. Kaur H, Halliwell B. Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. *Chem Biol Interact.* 1990;73:235-47.
188. Kayatekin BM, Gönenç S, Açıkgöz O, Uysal N, Dayi A. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *Eur J Appl Physiol.* 2002;87:141-4.
189. Kean RB, Spitsin SV, Mikheeva T, Scott GS, Hooper DC. The peroxynitrite scavenger uric acid prevents inflammatory cell invasion into the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis through maintenance of blood-central nervous system barrier integrity. *J Immunol.* 2000;165:6511-8.
190. Keevil JG, Osman HE, Reed JD, Folts JD. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr.* 2000;130:53-6.
191. Kerksick C, Willoughby D. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J Intern Soc Sports Nutr.* 2005;2:38-44.
192. Khanna S, Atalay M, Laaksonen DE, Gul M, Roy S, Sen CK. Alpha-lipoic acid supplementation: tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise. *J Appl Physiol.* 1999;86:1191-6.
193. Kijima I, Phung S, Hur G, Kwok SL, Chen S. Grape seed extract is an aromatase inhibitor and a suppressor of aromatase expression. *Cancer Res.* 2006;66:5960-7.
194. Knez WL, Jenkins DG, Coombes JS. Oxidative stress in half and full Ironman triathletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39:283-8.

195. Koga T, Moro K, Nakamori K, Yamakoshi J, Hosoyama H, Kataoka S, Ariga T. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *J Agric Food Chem.* 1999;47:1892-7.
196. Kohen R, Vellaichamy E, Hrbac J, Gati I, Tirosh O. Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:871-9.
197. Kon M, Kimura F, Akimoto T, Tanabe K, Murase Y, Ikemune S, Kono I. Effect of Coenzyme Q10 supplementation on exercise-induced muscular injury of rats. *Exerc Immunol Rev.* 2007;13:76-88.
198. Kovac V, Alonso E, Revilla E. The effect of adding supplementary quantities of seeds during fermentation on the phenolic composition of wines. *Am J Enol Vitic.* 1995;46:363-7.
199. Kretzschmar M, Müller D, Hübscher J, Marin E, Klinger W. Influence of aging, training and acute physical exercise on plasma glutathione and lipid peroxides in man. *Int J Sports Med.* 1991;12:218-22.
200. Kromhout D. Diet and cardiovascular diseases. *J Nutr Health Aging.* 2001;5:144-9.
201. Kumar CT, Reddy VK, Prasad M, Thyagaraju K, Reddanna P. Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Mol Cell Biochem.* 1992;111:109-15.
202. Kyparos A, Salonikidis K, Nikolaidis MG, Kouretas D. Short duration exhaustive aerobic exercise induces oxidative stress: a novel play-oriented volitional fatigue test. *J Sports Med Phys Fitness.* 2007;47:483-90.
203. Langfort J, Czarnowski D, Pilis W, Wójcik B, Górski J. Effect of various types of exercise training on 5'-nucleotidase and adenosine deaminase activities in rat heart: influence of a single bout of endurance exercise. *Biochem Mol Med.* 1996;59:28-32.
204. Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK, Korthuis RJ. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *J Appl Physiol.* 1990;68:2337-43.
205. Leaf DA, Kleinman MT, Hamilton M, Barstow TJ. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation, *Med Sci Sports Exerc.* 1997;29:1036-9.
206. Leeuwenburgh C, Fiebig R, Chandwaney R, Ji LL. Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol.* 1994;267:439-45.
207. Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths M, Gore M, Ji LL. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol.* 1997;272:363-9.
208. Leeuwenburgh C, Hansen P, Shaish A, Holloszy JO, Heinecke JW. Markers of protein oxidation by hydroxyl radical and reactive nitrogen species in tissues of aging rats. *Am J Physiol.* 1998;274:453-61.
209. Leeuwenburgh C, Ji LL. Glutathione and glutathione ethyl ester supplementation of mice alter glutathione homeostasis during exercise. *J Nutr.* 1998;128:2420-6.
210. Leeuwenburgh C, Hansen PA, Holloszy JO, Heinecke JW. Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:186-92.
211. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem.* 2001;8:829-38.
212. Lekhi C, Gupta PH, Singh B. Influence of exercise on oxidant stress products in elite Indian cyclists. *Br J Sports Med.* 2007;41:691-3

213. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1366:53-67.
214. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med*. 2002;32:790-6.
215. Lew H, Pyke S, Quintanilha A. Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. *FEBS Lett*. 1985;185:262-6.
216. Li WG, Zhang XY, Wu YJ, Tian X. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacol Sin*. 2001;22:1117-20.
217. Liebler DC, Kling DS, Reed DJ. Antioxidant protection of phospholipid bilayers by alpha-tocopherol. Control of alpha-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione. *J Biol Chem*. 1986;261:12114-9.
218. Lin WT, Yang SC, Chen KT, Huang CC, Lee NY. Protective effects of L-arginine on pulmonary oxidative stress and antioxidant defenses during exhaustive exercise in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2005;26:992-9.
219. Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N, Kopsidas G, Kovalenko S, Papakostopoulos P, Eastwood H, Graves S, Richardson M. Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;959:396-411.
220. Liu CC, Huang CC, Lin WT, Hsieh CC, Huang SY, Lin SJ, Yang SC. Lycopene supplementation attenuated xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in skeletal muscle tissues of rats after exhaustive exercise. *Br J Nutr*. 2005;94:595-601.
221. Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW, Brooks GA, Ames BN. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol*. 2000;89:21-8.
222. Liu ML, Bergholm R, Mäkimattila S, Lahdenperä S, Valkonen M, Hilden H, Yki-Järvinen H, Taskinen MR. A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *Am J Physiol*. 1999;276:1083-91.
223. Lotito SB, Actis-Goretta L, Renart ML, Caligiuri M, Rein D, Schmitz HH, Steinberg FM, Keen CL, Fraga CG. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276:945-51.
224. Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, Belcastro AN. Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1987;56:313-6.
225. Ma L, Gao HQ, Li BY, Ma YB, You BA, Zhang FL. Grape seed proanthocyanidin extracts inhibit vascular cell adhesion molecule expression induced by advanced glycation end products through activation of peroxisome proliferators-activated receptor gamma. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;49:293-8.
226. Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction? *Acta Physiol Scand*. 2001;171:233-9.
227. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:727-47.
228. Margaritis I, Tessier F, Richard MJ, Marconnet P. No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *Int J Sports Med*. 1997;18:186-90.

229. Marklund N, Ostman B, Nalmo L, Persson L, Hillered L. Hypoxanthine, uric acid and allantoin as indicators of in vivo free radical reactions. Description of a HPLC method and human brain microdialysis data. *Acta Neurochir (Wien)*. 2000;142:1135-41.
230. Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L, Della Valle G. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness*. 1997;37:235-9.
231. Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med*. 2001;31:911-22.
232. Mastaloudis A, Morrow JD, Hopkins DW, Devaraj S, Traber MG. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic Biol Med*. 2004;36:1329-41.
233. Mattoo TK, Kovacevic L. Effect of grape seed extract on puromycin-aminonucleoside-induced nephrosis in rats. *Pediatr Nephrol*. 2003;18:872-7.
234. Matuschek E, Towo E, Svanberg U. Oxidation of polyphenols in phytate-reduced high-tannin cereals: effect on different phenolic groups and on in vitro accessible iron. *J Agric Food Chem*. 2001;49:5630-8.
235. May JM, Qu ZC, Whitesell RR, Cobb CE. Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med*. 1996;20:543-51.
236. McAnulty SR, McAnulty LS, Nieman DC, Morrow JD, Utter AC, Dumke CL. Effect of resistance exercise and carbohydrate ingestion on oxidative stress. *Free Radic Res*. 2005a;39:1219-24
237. McAnulty SR, McAnulty LS, Nieman DC, Morrow JD, Shooter LA, Holmes S, Heward C, Henson DA. Effect of alpha-tocopherol supplementation on plasma homocysteine and oxidative stress in highly trained athletes before and after exhaustive exercise. *J Nutr Biochem*. 2005b;16:530-7.
238. McArdle A, Pattwell D, Vasilaki A, Griffiths RD, Jackson MJ. Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280:621-7.
239. McBride JM, Kraemer WJ, Triplett-McBride T, Sebastianelli W. Effect of resistance exercise on free radical production. *Med Sci Sports Exerc*. 1998;30:67-72
240. Meagher EA, FitzGerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:1745-50.
241. Melikoglu MA, Kaldirimci M, Katkat D, Sen I, Kaplan I, Senel K. The effect of regular long term training on antioxidant enzymatic activities. *J Sports Med Phys Fitness*. 2008;48:388-90.
242. Mena P, Maynar M, Gutierrez JM, Maynar J, Timon J, Campillo JE. Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. Adaptation to training. *Int J Sports Med*. 1991;12:563-6.
243. Meneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med*. 1997;23:783-92.
244. Metin G, Gümüştas MK, Uslu E, Belce A, Kayserilioglu A. Effect of regular training on plasma thiols, malondialdehyde and carnitine concentrations in young soccer players. *Chin J Physiol*. 2003;46:35-9.
245. Meydani M, Evans WJ, Handelman G, Biddle L, Fielding RA, Meydani SN, Burrill J, Fiatarone MA, Blumberg JB, Cannon JG. Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *Am J Physiol*. 1993;264:992-8.

246. Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem.* 1972;247:6960-2.
247. Mittal A, Elmets CA, Katiyar SK. Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation. *Carcinogenesis.* 2003;24:1379-88.
248. Miyagi Y, Miwa K, Inoue H. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am J Cardiol.* 1997;80:1627-31.
249. Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, Haga S, Ji LL, Ohno H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol* 2001;84:1-6
250. Morán M, Delgado J, González B, Manso R, Megías A. Responses of rat myocardial antioxidant defences and heat shock protein HSP72 induced by 12 and 24-week treadmill training. *Acta Physiol Scand.* 2004;180:157-66.
251. Moraska A, Deak T, Spencer RL, Roth D, Fleshner M. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279:1321-9.
252. Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res.* 1983;24:1070-6.
253. Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Brasaemle DL, Fried SK, Raskin I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition.* 2003;19:876-9.
254. Morillas-Ruiz JM, Villegas García JA, López FJ, Vidal-Guevara ML, Zafrilla P. Effects of polyphenolic antioxidants on exercise-induced oxidative stress. *Clin Nutr.* 2006;25:444-53.
255. Morin B, Narbonne JF, Ribera D, Badouard C, Ravanat JL. Effect of dietary fat-soluble vitamins A and E and proanthocyanidin-rich extract from grape seeds on oxidative DNA damage in rats. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:787-96.
256. Mueller AR, Platz KP, Langrehr JM, Hoffman RA, Nussler AK, Nalesnik M, Billiar TR, Schraut WH. The effects of administration of nitric oxide inhibitors during small bowel preservation and reperfusion. *Transplantation.* 1994;58:1309-16.
257. Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Tokimitsu I, Hase T. Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290:1550-6.
258. Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, Mann NJ, Sinclair AJ. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1466-73.
259. Nakagawa T, Yokozawa T, Satoh A, Kim HY. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury by proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2005;51:283-6.
260. Nakamura Y, Tonogai Y. Metabolism of grape seed polyphenol in the rat. *J Agric Food Chem.* 2003;51:7215-25.
261. Natella F, Belevi F, Gentili V, Ursini F, Scaccini C. Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans. *J Agric Food Chem.* 2002;50:7720-5.
262. Navarro A, Gomez C, López-Cepero JM, Boveris A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286:505-11.

263. Navarro-Arévalo A, Cañavate C, Sánchez-del-Pino MJ. Myocardial and skeletal muscle aging and changes in oxidative stress in relationship to rigorous exercise training. *Mech Ageing Dev.* 1999;108:207-17.
264. Nigdikar SV, Williams NR, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:258-65.
265. Nishizawa J, Nakai A, Matsuda K, Komeda M, Ban T, Nagata K. Reactive oxygen species play an important role in the activation of heat shock factor 1 in ischemic-reperfused heart. *Circulation.* 1999;99:934-41.
266. Nohl H, Jordan W. The mitochondrial site of superoxide formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;138:533-9.
267. Oh-ishi S, Toshinai K, Kizaki T, Haga S, Fukuda K, Nagata N, Ohno H. Effects of aging and/or training on antioxidant enzyme system in diaphragm of mice. *Respir Physiol.* 1996;105:195-202.
268. Oh-ishi S, Kizaki T, Ookawara T, Sakurai T, Izawa T, Nagata N, Ohno H. Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:1579-85.
269. Ohno H, Yahata T, Sato Y, Yamamura K, Taniguchi N. Physical training and fasting erythrocyte activities of free radical scavenging enzyme systems in sedentary men. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1988;57:173-6.
270. O'Neill CA, Stebbins CL, Bonigut S, Halliwell B, Longhurst JC. Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats. *J Appl Physiol.* 1996;81:1197-206.
271. Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J.* 2001;357:241-7.
272. Ortenblad N, Madsen K, Djurhuus MS. Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. *Am J Physiol.* 1997;272:1258-63.
273. Ozhogina OA, Kasaikina OT. Beta-carotene as an interceptor of free radicals. *Free Radic Biol Med.* 1995;19:575-81.
274. Ozyurt B, Iraz M, Koca K, Ozyurt H, Sahin S. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury in rats. *Mol Cell Biochem.* 2006;292:197-203.
275. Ozyurt H, Irmak MK, Akyol O, Söğüt S. Caffeic acid phenethyl ester changes the indices of oxidative stress in serum of rats with renal ischaemia-reperfusion injury. *Cell Biochem Funct.* 2001;19:259-63.
276. Packer JE, Slater TF, Willson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature.* 1979;278:737-8.
277. Packer L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci.* 1997;15:353-63.
278. Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Morrow JD. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol.* 2003;89:100-7
279. Panza VS, Wazlawik E, Ricardo Schütz G, Comin L, Hecht KC, da Silva EL. Consumption of green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men. *Nutrition.* 2008;24:433-42.
280. Pataki T, Bak I, Kovacs P, Bagchi D, Das DK, Tosaki A. Grape seed proanthocyanidins improved cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts. *Am J Clin Nutr.* 2002;75:894-9.

281. Peng N, Clark JT, Prasain J, Kim H, White CR, Wyss JM. Antihypertensive and cognitive effects of grape polyphenols in estrogen-depleted, female, spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289:771-5.
282. Petibois C, Cazorla G, Poortmans JR, Déléris G. Biochemical aspects of overtraining in endurance sports: a review. *Sports Med.* 2002;32:867-78
283. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63:1035-42.
284. Pincemail J, Lecomte J, Castiau J, Collard E, Vasankari T, Cheramy-Bien J, Limet R, Defraigne J. Evaluation of autoantibodies against oxidized LDL and antioxidant status in top soccer and basketball players after 4 months of competition. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:559-65.
285. Pinent M, Blay M, Bladé MC, Salvadó MJ, Arola L, Ardévol A. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology.* 2004;145:4985-90.
286. Powers SK, Criswell D, Lawler J, Martin D, Lieu FK, Ji LL, Herb RA. Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am J Physiol.* 1993;265:2094-8.
287. Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA, Dudley G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1994;266:375-80.
288. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* 1999;31:987-97.
289. Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.* 1999;58:1025-33.
290. Prajda N, Weber G. Malignant transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas. *FEBS Lett.* 1975;59:245-9.
291. Preuss HG, Wallerstedt D, Talpur N, Tutuncuoglu SO, Echard B, Myers A, Bui M, Bagchi D. Effects of niacin-bound chromium and grape seed proanthocyanidin extract on the lipid profile of hypercholesterolemic subjects: a pilot study. *J Med.* 2000;31:227-46.
292. Preuss HG, Montamarry S, Echard B, Scheckenbach R, Bagchi D. Long-term effects of chromium, grape seed extract, and zinc on various metabolic parameters of rats. *Mol Cell Biochem.* 2001;223:95-102.
293. Prior BM, Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL. Exercise-induced vascular remodeling. *Exerc Sport Sci Rev.* 2003;31:26-33.
294. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:1173-81.
295. Quindry JC, Stone WL, King J, Broeder CE. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35:1139-45.
296. Quintanilha AT. Effects of physical exercise and/or vitamin E on tissue oxidative metabolism. *Biochem Soc Trans.* 1984;12:403-4.
297. Radák Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J Appl Physiol.* 1995;79:129-35.
298. Radak Z, Nakamura A, Nakamoto H, Asano K, Ohno H, Goto S. A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in the lungs of rats. *Pflugers Arch.* 1998;435:439-41

299. Radák Z, Pucsok J, Mecseki S, Csont T, Ferdinandy P. Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 1999a;26:1059-63.
300. Radák Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvári M, Nyakas C, Goto S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med.* 1999b;27:69-74.
301. Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev.* 2008;7:34-42.
302. Rahnema N, Gaeini AA, Hamedinia MR. Oxidative stress responses in physical education students during 8 weeks aerobic training. *J Sports Med Phys Fitness.* 2007;47:119-23.
303. Rall LC, Roubenoff R, Meydani SN, Han SN, Meydani M. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a marker of oxidative stress in rheumatoid arthritis and aging: effect of progressive resistance training. *J Nutr Biochem.* 2000;11:581-4.
304. Ramel A, Wagner KH, Elmadfa I. Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men *Eur J Nutr.* 2004;43:2-6
305. Rapport L, Lockwood B. Proanthocyanidins and grape seed extract. *Pharm J.* 2001;266:581-4.
306. Rasmussen SE, Frederiksen H, Struntze Krogholm K, Poulsen L. Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49:159-74.
307. Ravi Kiran T, Subramanyam MV, Asha Devi S. Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2004;137:187-96.
308. Ravi Kiran T, Subramanyam MV, Prathima S, Asha Devi S. Blood lipid profile and myocardial superoxide dismutase in swim-trained young and middle-aged rats: comparison between left and right ventricular adaptations to oxidative stress. *J Comp Physiol [B].* 2006;176:749-62.
309. Ray SD, Kumar MA, Bagchi D. A novel proanthocyanidin IH636 grape seed extract increases in vivo Bcl-XL expression and prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver. *Arch Biochem Biophys.* 1999;369:42-58.
310. 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;107:137-66.
311. Ray SD, Parikh H, Hickey E, Bagchi M, Bagchi D. Differential effects of IH636 grape seed proanthocyanidin extract and a DNA repair modulator 4-aminobenzamide on liver microsomal cytochrome 4502E1-dependent aniline hydroxylation. *Mol Cell Biochem.* 2001a;218:27-33.
312. Ray SD, Bagchi D, Lim PM, Bagchi M, Gross SM, Kothari SC, Preuss HG, Stohs SJ. Acute and long-term safety evaluation of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2001b;109:165-97.
313. Reed J. Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2002;42:301-16.
314. Reed JD Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J Anim Sci.* 1995;73:1516-28.
315. Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS. Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol.* 1992;73:1797-804.

316. Reid MB, Stokić DS, Koch SM, Khawli FA, Leis AA. N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans. *J Clin Invest.* 1994;94:2468-74.
317. Reid MB. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol.* 2001;90:724-31.
318. Reid MB. Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:169-79.
319. Rein D, Paglieroni TG, Pearson DA, Wun T, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *J Nutr.* 2000;130:2120-6.
320. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992;339:1523-6.
321. Reznick AZ, Witt E, Matsumoto M, Packer L. Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;189:801-6.
322. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20:933-56.
323. Rimbach G, Höhler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, Packer L. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr.* 1999;52:203-22.
324. Rios LY, Bennett RN, Lazarus SA, Rémésy C, Scalbert A, Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:1106-10.
325. Rios LY, Gonthier MP, Rémésy C, Mila I, Lapiere C, Lazarus SA, Williamson G, Scalbert A. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:912-8.
326. Robertson JD, Maughan RJ, Duthie GG, Morrice PC. Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clin Sci (Lond).* 1991;80:611-8.
327. Roychowdhury S, Wolf G, Keilhoff G, Bagchi D, Horn T. Protection of primary glial cells by grape seed proanthocyanidin extract against nitrosative/oxidative stress. *Nitric Oxide.* 2001;5:137-49.
328. Rutkiewicz J, Górski J. Effect of exercise on adenosine deaminase activity in rat skeletal muscles. *J Physiol Pharmacol.* 1992;43:219-22.
329. Sachdev S, Davies KJ. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:215-23.
330. Sahlin K, Cizinsky S, Warholm M, Höberg J. Repetitive static muscle contractions in humans--a trigger of metabolic and oxidative stress? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1992;64:228-36.
331. Saito M, Hosoyama H, Ariga T, Kataoka S, Yamaji N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *J Agric Food Chem.* 1998;46:1460-4.
332. Sánchez-Quesada JL, Jorba O, Payés A, Otal C, Serra-Grima R, González-Sastre F, Ordóñez-Llanos J. Ascorbic acid inhibits the increase in low-density lipoprotein (LDL) susceptibility to oxidation and the proportion of electronegative LDL induced by intense aerobic exercise. *Coron Artery Dis.* 1998;9:249-55.
333. Sano A, Yamakoshi J, Tokutake S, Tobe K, Kubota Y, Kikuchi M. Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67:1140-3.
334. Santos-Buelga C; Francia-Aricha EM; Escribano-Bailon MT. Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chem.* 1995;53:197-201.

335. Santos-Buelga C, Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric*. 2000;80:1094-117.
336. Sastre J, Asensi M, Gascó E, Pallardó FV, Ferrero JA, Furukawa T, Viña J. Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol*. 1992;263:992-5.
337. Sato M, Maulik G, Ray PS, Bagchi D, Das DK. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:1289-97.
338. Sato M, Maulik N, Das DK. Cardioprotection with alcohol: role of both alcohol and polyphenolic antioxidants. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;957:122-35.
339. Saxton JM, Donnelly AE, Roper HP. Indices of free-radical-mediated damage following maximum voluntary eccentric and concentric muscular work. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1994;68:189-93.
340. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*. 2000;130:2073-85.
341. Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kühn H, Sies H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem*. 2001;382:1687-96.
342. Schewe T, Kühn H, Sies H. Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *J Nutr*. 2002;132:1825-9.
343. Schippinger G, Wonisch W, Abuja PM, Fankhauser F, Winklhofer-Roob BM, Halwachs G. Lipid peroxidation and antioxidant status in professional American football players during competition. *Eur J Clin Invest*. 2002;32:686-92.
344. Schröder H, Navarro E, Tramullas A, Mora J, Galiano D. Nutrition antioxidant status and oxidative stress in professional basketball players: effects of a three compound antioxidative supplement. *Int J Sports Med*. 2000;21:146-50.
345. Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van der Vliet A, Cross CE, Tritschler H, Halliwell B. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radic Res*. 1994;20:119-33.
346. Sehrlirli O, Ozel Y, Dulundu E, Topaloglu U, Ercan F, Sener G. Grape seed extract treatment reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Phytother Res*. 2008;22:43-8.
347. Selamoglu S, Turgay F, Kayatekin BM, Gönenc S, Yslegen C. Aerobic and anaerobic training effects on the antioxidant enzymes of the blood. *Acta Physiol Hung*. 2000;87:267-73.
348. Sen CK, Marin E, Kretzschmar M, Hänninen O. Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J Appl Physiol*. 1992;73:1265-72.
349. Sen CK, Atalay M, Hänninen O. Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. *J Appl Physiol*. 1994;77:2177-87.
350. Sen CK, Kolosova I, Hänninen O, Orlov SN. Inward potassium transport systems in skeletal muscle derived cells are highly sensitive to oxidant exposure. *Free Radic Biol Med*. 1995;18:795-800.
351. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J*. 1996;10:709-20.
352. Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:653-69.

353. Sen CK, Bagchi D. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract. *Mol Cell Biochem.* 2001;216:1-7.
354. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33:368-70.
355. Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A. Red wine, tea, and antioxidants. *Lancet.* 1994;344:626
356. Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur J Clin Nutr.* 1996;50:28-32.
357. Sevanian A, Davies KJ, Hochstein P. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr.* 1991;54:1129-34.
358. Shahidi F, Wanasundara PK. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1992;32:67-103.
359. Shang F, Lu M, Dudek E, Reddan J, Taylor A. Vitamin C and vitamin E restore the resistance of GSH-depleted lens cells to H₂O₂. *Free Radic Biol Med.* 2003;34:521-30.
360. Shanmuganayagam D, Beahm MR, Osman HE, Krueger CG, Reed JD, Folts JD. Grape seed and grape skin extracts elicit a greater antiplatelet effect when used in combination than when used individually in dogs and humans. *J Nutr.* 2002;132:3592-8.
361. Shao ZH, Vanden Hoek TL, Xie J, Wojcik K, Chan KC, Li CQ, Hamann K, Qin Y, Schumacker PT, Becker LB, Yuan CS. Grape seed proanthocyanidins induce pro-oxidant toxicity in cardiomyocytes. *Cardiovasc Toxicol.* 2003;3:331-9.
362. Shao ZH, Hsu CW, Chang WT, Waypa GB, Li J, Li D, Li CQ, Anderson T, Qin Y, Schumacker PT, Becker LB, Hoek TL. Cytotoxicity induced by grape seed proanthocyanidins: role of nitric oxide. *Cell Biol Toxicol.* 2006;22:149-58.
363. Sharma SD, Katiyar SK. Dietary grape-seed proanthocyanidin inhibition of ultraviolet B-induced immune suppression is associated with induction of IL-12. *Carcinogenesis.* 2006;27:95-102.
364. Sharp PE, La Regina MC. The laboratory rat, In: Suckow MA, ed. Florida: CRC Press LLC, 1998; p. 17.
365. Shenoy SF, Keen CL, Kalgaonkar S, Polagruto JA. Effects of grape seed extract consumption on platelet function in postmenopausal women. *Thromb Res.* 2007;121:431-2.
366. Shimomura Y, Suzuki M, Sugiyama S, Hanaki Y, Ozawa T. Protective effect of coenzyme Q10 on exercise-induced muscular injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;176:349-55.
367. Silveira EM, Rodrigues MF, Krause MS, Vianna DR, Almeida BS, Rossato JS, Oliveira LP Jr, Curi R, de Bittencourt PI Jr. Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NF-kappaB pathways. *Cell Biochem Funct.* 2007;25:63-73.
368. Simonetti P, Ciappellano S, Gardana C, Bramati L, Pietta P. Procyanidins from *Vitis vinifera* seeds: in vivo effects on oxidative stress. *J Agric Food Chem.* 2002;50:6217-21.
369. Singh RP, Tyagi AK, Dhanalakshmi S, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. *Int J Cancer.* 2004;108:733-40.
370. Singletary KW, Meline B. Effect of grape seed proanthocyanidins on colon aberrant crypts and breast tumors in a rat dual-organ tumor model. *Nutr Cancer.* 2001;39:252-8.
371. Sjödin B, Hellsten Westing Y, Apple FS. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* 1990;10:236-54.

372. Skenderi KP, Tsironi M, Lazaropoulou C, Anastasiou CA, Matalas AL, Kanavaki I, Thalmann M, Goussetis E, Papassotiriou I, Chrousos GP. Changes in free radical generation and antioxidant capacity during ultramarathon foot race. *Eur J Clin Invest.* 2008;38:159-65.
373. Smolka MB, Zoppi CC, Alves AA, Silveira LR, Marangoni S, Pereira-Da-Silva L, Novello JC, Macedo DV. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279:1539-45.
374. Somani SM, Frank S, Rybak LP. Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995a;51:627-34.
375. Somani SM, Arroyo CM. Exercise training generates ascorbate free radical in rat heart. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1995b;39:323-9.
376. Spencer JP, Chaudry F, Pannala AS, Srail SK, Debnam E, Rice-Evans C. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;272:236-41.
377. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:191-208.
378. Stanković M, Tesević V, Vajs V, Todorović N, Milosavljević S, Godevac D. Antioxidant properties of grape seed extract on human lymphocyte oxidative defence. *Planta Med.* 2008;74:730-5.
379. Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 1999;100:1050-5.
380. Stokke O. Clinical chemical changes in physical activity. *Scand J Soc Med Suppl.* 1982;29:93-101.
381. Sumida S, Tanaka K, Kitao H, Nakadomo F. Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation. *Int J Biochem.* 1989;21:835-8.
382. Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med.* 2002;32:314-8.
383. Sureda A, Tauler P, Aguilo A, Cases N, Fuentespina E, Cordova A, Tur JA, Pons A. Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Radic Res.* 2005;39:1317-24
384. Sureda A, Tauler P, Aguilo A, Fuentespina E, Cordova A, Tur JA, Pons A. Blood cell NO synthesis in response to exercise. *Nitric Oxide.* 2006;15:5-12
385. Suzuki Y. Synergism of ascorbic acid and glutathione in the reduction of hexavalent chromium in vitro. *Ind Health.* 1990;28:9-19.
386. Svensson MB, Ekblom B, Cotgreave IA, Norman B, Sjöberg B, Ekblom O, Sjödin B, Sjödin A. Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta Physiol Scand.* 2002;176:43-56.
387. Takanami Y, Iwane H, Kawai Y, Shimomitsu T. Vitamin E supplementation and endurance exercise: are there benefits? *Sports Med.* 2000;29:73-83.
388. Tanaka N, Sekiya N, Hattori M, Goto H, Shibahara N, Shimada Y, Terasawa K. Measurement of plasma procyanidin B-2 and procyanidin B-3 levels after oral administration in rat. *Phytomedicine.* 2003;10:122-6.
389. Tauler P, Aguilo A, Gimeno I, Guix P, Tur JA, Pons A. Different effects of exercise tests on the antioxidant enzyme activities in lymphocytes and neutrophils. *J Nutr Biochem.* 2004;15:479-84

390. Tauler P, Aguilo A, Gimeno I, Fuentespina E, Tur JA, Pons A. Response of blood cell antioxidant enzyme defences to antioxidant diet supplementation and to intense exercise. *Eur J Nutr.* 2006;45:187-95
391. Tebib K, Besançon P, Rouanet JM. Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases and tissue lipids in rats fed hypercholesterolemic diets. *J Nutr.* 1994;124:2451-7.
392. Tebib K, Besançon P, Rouanet J. Effects of dietary grape seed tannins on rat cecal fermentation and colonic bacterial enzymes. *Nutr Res.* 1996;16:105-10.
393. Terblanche SE. The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats. *Cell Biol Int.* 2000;23:749-53.
394. Terentis AC, Thomas SR, Burr JA, Liebler DC, Stocker R. Vitamin E oxidation in human atherosclerotic lesions. *Circ Res.* 2002;90:333-9.
395. Tessier F, Margaritis I, Richard MJ, Moynot C, Marconnet P. Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance. *Med Sci Sports Exerc.* 1995;27:390-6.
396. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition.* 2000;16:716-8.
397. Thompson D, Williams C, Garcia-Roves P, McGregor SJ, McArdle F, Jackson MJ. Post-exercise vitamin C supplementation and recovery from demanding exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2003;89:393-400
398. Thompson-Gorman SL, Zweier JL. Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *J Biol Chem.* 1990;265:6656-63.
399. Tiidus PM, Houston ME. Vitamin E status does not affect the responses to exercise training and acute exercise in female rats. *J Nutr.* 1993;123:834-40.
400. Tiidus PM, Pushkarenko J, Houston ME. Lack of antioxidant adaptation to short-term aerobic training in human muscle. *Am J Physiol.* 1996;271:832-6.
401. Tiidus PM. Radical species in inflammation and overtraining. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998;76:533-8.
402. Umegaki K, Daohua P, Sugisawa A, Kimura M, Higuchi M. Influence of one bout of vigorous exercise on ascorbic acid in plasma and oxidative damage to DNA in blood cells and muscle in untrained rats. *J Nutr Biochem.* 2000;11:401-7.
403. Urquiaga I, Leighton F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol Res.* 2000;33:55-64.
404. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 2003;189:41-54.
405. Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, Vuorimaa T, Ahotupa M. Effects of acute prolonged exercise on-serum and LDL oxidation and antioxidant defences. *Free Radic Biol Med.* 1997;22:509-13.
406. Venditti P, Di Meo S. Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int J Sports Med.* 1997;18:497-502.
407. Vider J, Lehtmaa J, Kullisaar T, Vihalemm T, Zilmer K, Kairane C, Landõr A, Karu T, Zilmer M. Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology.* 2001;7:263-70.
408. Villa-Caballero L, Nava-Ocampo AA, Frati-Munari AC, Rodríguez de León SM, Becerra-Pérez AR, Ceja RM, Campos-Lara MG, Ponce-Monter HA. Hemodynamic and oxidative stress profile after exercise in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;75:285-91.

409. Viña J, Gimeno A, Sastre J, Desco C, Asensi M, Pallardó FV, Cuesta A, Ferrero JA, Terada LS, Repine JE. Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life*. 2000;49:539-44.
410. Vincent KR, Vincent HK, Braith RW, Lennon SL, Lowenthal DT. Resistance exercise training attenuates exercise-induced lipid peroxidation in the elderly. *Eur J Appl Physiol*. 2002;87:416-23.
411. Vinson JA, Proch J, Bose P. MegaNatural((R)) Gold Grapeseed Extract: In Vitro Antioxidant and In Vivo Human Supplementation Studies. *J Med Food*. 2001a;4:17-26.
412. Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis*. 2001b;156:67-72.
413. Vinson JA, Mandarano MA, Shuta DL, Bagchi M, Bagchi D. Beneficial effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract and a niacin-bound chromium in a hamster atherosclerosis model. *Mol Cell Biochem*. 2002;240:99-103.
414. Vitseva O, Varghese S, Chakrabarti S, Folts JD, Freedman JE. Grape seed and skin extracts inhibit platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;46:445-51.
415. Vogels N, Nijs IM, Westerterp-Plantenga MS. The effect of grape-seed extract on 24 h energy intake in humans. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58:667-73.
416. Vollaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med*. 2005;35:1045-62
417. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:1-14.
418. Wallace WJ, Houtchens RA, Maxwell JC, Caughey WS. Mechanism of autooxidation for hemoglobins and myoglobins. Promotion of superoxide production by protons and anions. *J Biol Chem*. 1982;257:4966-77.
419. Wasowicz W, Neve S and Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem*. 1993;39:2522-6.
420. Watson TA, Callister R, Taylor RD, Sibbritt DW, MacDonald-Wicks LK, Garg ML. Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2005;37:63-71.
421. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta*. 1987;924:408-19.
422. Westing YH, Ekblom B, Sjodin B. The metabolic relation between hypoxanthine and uric acid in man following maximal short-distance running. *Acta Physiol Scand*. 1989;137:341-5.
423. Wielinga PY, Louter-vd Haar J, Poelman MG, Romeijn M, Nieuwenhuizen AG, Scheurink AJW. The effect of (-)-hydroxycitric acid (HCA) and grape seed on food intake, body weight and metabolism. *Appetite*. 2002;39:106.
424. Willcox JK, Catignani GL, Roberts LJ. Dietary flavonoids fail to suppress F2-isoprostane formation in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2003;34:795-9.
425. Wiswedel I, Hirsch D, Kropf S, Gruening M, Pfister E, Schewe T, Sies H. Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F(2)-isoprostane concentrations in humans. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:411-21.

426. Witt EH, Reznick AZ, Viguie CA, Starke-Reed P, Packer L. Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J Nutr.* 1992;122:766-73.
427. Wollny T, Aiello L, Di Tommaso D, Bellavia V, Rotilio D, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L. Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. *Br J Pharmacol.* 1999;127:747-55.
428. Wren AF, Cleary M, Frantz C, Melton S, Norris L. 90-day oral toxicity study of a grape seed extract (IH636) in rats. *J Agric Food Chem.* 2002;50:2180-92.
429. Wu X, Cao G, Prior RL. Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J Nutr.* 2002;132:1865-71.
430. Xiao DS, Qian ZM. Plasma nitric oxide and iron concentrations in exercised rats are negatively correlated. *Mol Cell Biochem.* 2000;208:163-6.
431. Xu L, Li B, Cheng M, Zhang W, Pan J, Zhang C, Gao H. Oral administration of grape seed proanthocyanidin extracts downregulate RAGE dependant nuclear factor- kappa BP65 expression in the hippocampus of streptozotocin induced diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2008;116:215-24.
432. Yamakoshi J, Kataoka S, Koga T, Ariga T. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis.* 1999;142:139-49.
433. Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food Chem Toxicol.* 2002;40:599-607.
434. Ye X, Krohn RL, Liu W, Joshi SS, Kuszynski CA, McGinn TR, Bagchi M, Preuss HG, Stohs SJ, Bagchi D. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 1999;196:99-108.
435. You T, Goldfarb AH, Bloomer RJ, Nguyen L, Sha X, McKenzie MJ. Oxidative stress response in normal and antioxidant supplemented rats to a downhill run: changes in blood and skeletal muscles. *Can J Appl Physiol.* 2005;30:677-89.
436. Zhang FL, Gao HQ, Wu JM, Ma YB, You BA, Li BY, Xuan JH. Selective inhibition by grape seed proanthocyanidin extracts of cell adhesion molecule expression induced by advanced glycation end products in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;48:47-53.
437. Zhang XY, Bai DC, Wu YJ, Li WG, Liu NF. Proanthocyanidin from grape seeds enhances anti-tumor effect of doxorubicin both in vitro and in vivo. *Pharmazie.* 2005;60:533-8.

9. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Konya'da doğdu. İlkokul, Ortaokul ve Lise öğrenimini Konya'da tamamladı. 1996 yılında Fatih Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü burslu olarak kazandı ve 2001 yılında buradan mezun oldu. 2002 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve 2005 yılında tamamladı. 2005 yılında aynı bölümde açılan sınavı kazanarak doktora eğitimine başladı. 2002 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı AR-GE İleri Teknoloji Merkezinde göreve başladı. Bu merkez faaliyete geçene kadar geçici görevle Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görevlendirildi. 2005 yılında ise Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak görevlendirildi. Halen aynı Anabilim Dalında Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır.