تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر استرس اکسیداتیو ناشی از فعالیت ورزشی در اسبچه خزر

- **انسیه فتحی‌زاده** *: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا
- **سیدمحسن احمدی‌نژاد:** موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، صندوق پستی: ۱۷۸۳-۱۳۱٤٥
- **سیروس اشیدری:** گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹٥ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹٥

چکیده

به‌منظور بررسی اثرات استفاده ویتامین‌های E، C و ترکیبی از این دو در کاهش تنش‌های اکسیداتیو در اسبچه خزر، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تیمار و ٤ تکرار بر روی ١٦ راس اسبچه خزر به‌مدت۲۱ روز (سه هفته) انجام شد. اسبچه‌های مورد مطالعه، از سلامت کامل برخوردار بودند و میانگین سنی آن‌ها ۸/٥ سال(۱۰-۷ سال) و میانگین وزنی ۲۲۰ کیلوگرم (۲٤۰-۲۰۰ کیلوگرم) بود. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- گروه شاهد (یونجه همراه با کاه یاکلش)، ۲- گروه حاوی جیره شاهد به اضافه میزان ٦ گرم ویتامین E محاسبه شده بر حسب وزن در روز در تمام دوره آزمایش، ۳- گروه حاوی جیره شاهد به‌همراه مقدار ۷ گرم ویتامین C در روز در تمام دوره آزمایش، ٤- گروه حاوی جیره شاهد به همراه ویتامین E+C به‌ترتیب ٦ و ۷ گرم در روز بود. نمونه‌های خونی از تمامی اسبچه‌ها در زمان استراحت و بلافاصله پس از تنش ورزشی، اخذ شد. سرم‌های تهیه شده، در آزمایشگاه به‌وسیله HPLC، اتانالایزر و اسپکتوفوتومتر آنالیز شدند. براساس نتایج به‌دست آمده استفاده از افزودنی بر سطح آنزیم‌های آسپارتات‌آمینوترانسفراز، کراتین‌کیناز و گلوتاتیون‌پراکسیداز سرم خون معنی‌دار نبود (p≥۰/۰٥). ولی اثر افزودنی بر سطح ویتامینC و ویتامین E معنی‌دار بود (p≤۰/۰٥). اثر ورزش بر سطح آنزیم آسپارتات‌آمینوترانسفراز و ویتامین C معنی‌دار بود (p≤۰/۰٥)و اثرات متقابل ورزش و افزودنی بر هیچ‌یک از صفات مورد بررسی معنی‌دار نبود (p≥۰/۰٥). در کل با استفاده توأم ویتامین C و E سبب ایجاد بالاترین سطح سوپراکسید دیسموتاز و ویتامین‌های C و E در سرم اسبچه‌ها شد.

کلمات کلیدی: اسبچه خزر، استرس اکسیداتیو، آنتی اکسیدان، رادیکال آزاد، ویتامین E، ویتامین C

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Ensieh_fathizadeh@yahoo.com

مقدمه

مطالعات زیادی وجود دارد، که نشان می‌دهند، فعالیت فیزیکی شدید و ورزش توأم با استرس باعث آسیب به DNA می‌شود. رادیکال‌های آزاد موجب پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشائی، شکسته شدن زنجیره DNA و دناتوره شدن پروتئین‌ها می‌شوند (Inoue و همکاران، ۱۹۹۵). انواع گوناگونی از دفاع آنتی‌اکسیدانی در موجودات هوازی پدید آمده است. درواقع، آنتی‌اکسیدان ماده‌ای است که بتواند از آسیب اکسیداتیو[1] به یک مولکول هدف جلوگیری کند یا آن را به تأخیر اندازد. همه مولکول‌های موجود در بدن جانداران، شامل پپتیدها، پروتئین‌ها، نوکلئیک اسیدها و کربوهیدرات‌ها قابلیت آن را دارند، که در معرض آسیب اکسیداتیو قرار گیرند. برای مطالعه آنتی‌اکسیدان‌ها در آزمایشگاه باید ماده‌ای انتخاب شود، که هدف حمله قرار می‌گیرد. انتخاب این ماده ممکن است، به‌دلیل اهمیت آن یا سهولت اندازه‌گیری آسیب وارد برآن باشد. به‌طور مثال، حمله رادیکال آزاد به لیپید، به این مولکول آسیب می‌رساند (پراکسید شدن لیپیدی). این آسیب با آزمون‌های ساده‌ای اندازه‌گیری می‌شود. البته به‌جز لیپیدها، سایر اجزای سلول نیز ممکن است مورد حمله رادیکال‌ها قرار بگیرند و آسیب دیدن آن‌ها می‌تواند از اهمیت یکسان یا حتی بیش‌تری نیز برخوردار باشد. بنابراین، مطالعات آزمایشگاهی در مورد آنتی‌اکسیدان‌ها باید با توجه کامل به روش‌های مورد استفاده، مورد تفسیر قرار گیرند. به‌عبارت دیگر، بیان این‌که ماده الف آنتی‌اکسیدان مناسبی است، بدون مشخص کردن روش‌های مورد استفاده، بی‌معنا خواهد بود (میشل، ۱۳۷۷).

به عنوان نمونه رادیکال آزاد هیدروکسیل، فعال‌ترین رادیکال اکسیژنی است، این رادیکال توانایی زیادی برای آسیب رساندن و تخریب دارد، زیرا به‌محض تماس با هر مولکول بیولوژیکی، به آن حمله می‌کند و معمولاً موجب شروع واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد می‌شود (Halliwell و همکاران، ۱۹۹۹). در یک تقسیم‌بندی کلی می‌توان منابع تولیدکننده رادیکال‌های آزاد (عوامل آغازکننده اکسیداسیون) را به دو دسته عوامل بیرونی و داخلی تقسیم نمود. از مهم‌ترین عوامل بیرونی یا عوامل شیمیایی و فیزیکی می‌توان اشعه‌های یون‌ساز حتی نور خورشید، آلودگی هوا به‌خصوص دی‌اکسیدکربن و اکسیدنیتروژن و ترکیبات شیمیایی مانند تتراکلریدکربن (CCL_4) آلوده‌کننده‌های محیطی، حشره‌کش‌ها، بی‌هوش‌کننده‌ها، محلول‌های صنعتی و اُزن را نام برد (Yug، ۱۹۹۴). عوامل درونی یا زیستی شامل رادیکال‌های آزاد واکنش‌گر هستند که در اثر عواملی مانند اکسیدازها و اکسیدکننده‌ها به‌وجود می‌آیند. عوامل درونی در میتوکندری‌ها، فاگوسیت‌ها، پراکسیزوم‌ها، التهاب‌ها، فعالیت‌های سنگین بدنی و کم خونی‌های موضعی بروز می‌کنند. هر دو عامل خارجی و داخلی با ایجاد رادیکال آزاد و اکسیداسیون لیپیدها و لیپوپروتئین‌ها باعث لیپوفوشین زایی می‌شوند (Yug، ۱۹۹۴). لیپوفوشین، یا رنگیزه سن یک ماده خود فلورسنت است، که به‌طور فزاینده‌ای درون لیزوزوم‌های ثانویه در سلول‌های مختلفی از نسوج انسان و حیوانات تجمع می‌یابد. چون این تجمع برجسته‌ترین تظاهر سلولی پیری است، اغلب به‌عنوان یک شاخص پیری درنظرگرفته می‌شود و تحقیقات مختلف در مورد ساختمان، ترکیب و سرعت تجمع لیپوفوشین در انواع سلول‌های مختلف صورت گرفته است (Conchranc، ۱۹۹۷). در جریان استرس اکسیداتیو بافت‌های مختلفی مثل کلیه، ریه، قلب، پوست، مغز، مفاصل، مجاری معدی روده‌ای، چشم‌ها، عروق، گلبول‌های قرمز و دیگر بافت‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Karamanlioglu، ۲۰۰۲).

به‌طورکلی سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی به دو گروه آنزیمی و غیرآنزیمی تقسیم می‌شوند. سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (مهم‌ترین عوامل آنتی‌اکسیدانی در درون سلول‌ها) آنزیم‌هایی هم‌چون سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون‌پراکسیداز (GPX) و کاتالاز می‌باشند. سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی، مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌هایی که در این گروه قرار می‌گیرند، شامل ویتامین E (α توکوفرول)، کارتنوئیدها، اسیداسکوربیک، اسیداوریک و بیلی‌روبین می‌باشند (Thaler و همکاران، ۱۹۹۶). آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند با مکانیسم‌های مختلفی عمل نمایند. مکانیسم‌هایی همانند برداشت اکسیژن با کاهش غلظت موضعی اکسیژن، برداشت یون‌های فلزی کاتالیتیک مانند Fe^{+2} و Cu^{+2}، برداشت گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکسید O_2، هیدروژن پراکسید H_2O_2 و قطع‌کردن واکنش‌های زنجیره‌ای موثر باشند. برای مثال آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند در سطوحی همانند جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد، ترمیم صدمات ناشی از فعالیت رادیکال‌ها، افزایش دفع یا جذب مولکول‌های صدمه دیده و به حداقل رساندن موتاسیون عمل کنند (گاتریج، ۱۳۷۸).

براساس تحقیقات گذشته، مکمل‌سازی با ویتامین‌های E و C می‌تواند وضعیت α-توکوفرول و اسیداسکوربیک را در پونی‌های ورزش چوگان، بهبود بخشد، به‌خصوص در انتهای فصل مسابقه و زمانی‌که تمرینات طبق برنامه بیش از حد باشد. به‌طورکلی پونی‌های با فعالیت ورزشی شدید در مقایسه با گروهی با فعالیت ورزشی سبک، می‌توانند از مکمل‌های ویتامین E و C بهره بیش‌تری ببرند و کارآیی را در

[1]- آسیب اکسیداتیو، اصطلاحی کلی است که نشان‌دهنده حمله رادیکال‌های آزاد حاوی اکسیژن است مانند سوپراکسید ($O_2^{\cdot}$)

اسب‌هایی با فعالیت ورزشی سنگین بهبود می‌بخشد (Hoffman و همکاران، ۲۰۰۱).

باتوجه به مطالب ذکر شده، فعالیت‌های ورزشی شدید ۳۰-۱۰ برابر حالت عادی مصرف اکسیژن را افزایش می‌دهند، که این مسئله تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه تخریب عضلات و سایر بافت‌های بدن را افزایش می‌دهند. از طرفی براساس گزارشات بافت‌ها زمانی‌که در فعالیت‌های سخت و شدید قرار می‌گیرند، دفاع آنتی‌اکسیدانی خود را افزایش می‌دهند (Piccion و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین چگونه می‌توان از یک اسب مسابقه بر علیه رادیکال‌های آزاد ناشی از ورزش محافظت کرد؟ به‌عبارت دیگر، آیا یک اسب مسابقه باید آنتی‌اکسیدان مصرف کند؟ لذا این تحقیق با هدف بررسی اثرات استفاده از ویتامین C و E و مصرف توأم آن‌ها بر میزان آنزیم‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های سرم خون برای اولین‌بار در اسبچه‌های خزر انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۴ تکرار جمعاً ۱۶ رأس اسبچه‌خزر از مدرسه کاسپین اسب ایرانیان به شماره ثبت ۲۷۸۵۲ (به تعداد مساوی اخته و مادیان، با گروه سنی بین ۷ تا ۱۰سال) و جیره غذایی یکسان و شرایط ورزشی مشابه، به‌مدت ۲۱ روز (سه هفته) در باشگاه سوارکاری آزمون واقع در ضلع شرقی استادیوم آزادی، منطقه ۲۲ شهرداری تهران، از تاریخ یازدهم آذرماه سال ۱۳۹۱مورد اجراء گذاشته شد. اسبچه‌ها از میانگین وزنی بین ۲۰۰ الی ۲۴۰ کیلوگرم که تمامی از سلامت کامل برخوردار بوده‌اند، انتخاب شدند. هر یک از اسبچه‌ها به‌صورت تصادفی در هر یک از تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند. برای تصادفی کردن از روش قرعه‌کشی استفاده شد. تیمارها شامل: ۱) گروه شاهد، ۲) گروه حاوی جیره شاهد به‌اضافه میزان ۶ گرم ویتامینE[1] (ویتامینE جیره بر مبنای جدول NRC حداکثر ۵۰۰۰ واحد بین‌المللی Iu در روز) بر حسب وزن در روز در تمام دوره آزمایش، ۳) گروه حاوی جیره شاهد به‌همراه مقدار ۷ گرم ویتامین C در روز در تمام دوره آزمایش و ۴) گروه حاوی جیره شاهد به‌همراه ویتامین E+C به‌ترتیب ۶ و ۷ گرم در روز بود.

برای تهیه نمونه‌های خونی در پایان هفته سوم دو بار از تمامی اسبچه‌های موجود در هر تیمار خون‌گیری به‌عمل آمد، یک‌بار قبل از تمرین و در حالت استراحت و بار دیگر بلافاصله بعد از انجام فعالیت ورزشی از ورید گردن به‌مقدار ۱۰ سی‌سی خون، از هر حیوان گرفته شد. فعالیت ورزشی در این تحقیق به این صورت بود که اسبچه‌های موجود در هر تیمار به‌صورت گروهی مورد فعالیت ورزشی قرار می‌گرفتند. به اسبچه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه تمرین سبک جهت آماده و گرم شدن، داده می‌شد، سپس در پیست، فاصله مشخصی را طی می‌نمودند (۷۰۰ متر). در پایان مسیر ۷۰۰ متری که اسبچه‌ها به صورت یورتمه و چهارنعل طی می‌کردند، علائم حیاتی قابل کنترل (ضربان، نبض و تنفس) اندازه‌گیری و پس از اطمینان از این‌که میزان این فاکتورها مؤید تحت تنش (استرس) قرار گرفتن اسبچه بود، از حیوانات خون‌گیری به‌عمل آمد، نمونه خون‌های گرفته شده به لوله‌های آزمایشی بدون ماده ضدانعقاد منتقل شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه جهت بررسی پارامترهای مورد نظر ارسال شد. در آزمایشگاه نمونه‌ها سانتریفیوژ و سرم‌های تهیه شده در دمای ۲۰-جهت آزمایش‌ها نگه‌داری شدند (Williamsو همکاران، ۲۰۰۴؛ Hoffman و همکاران، ۲۰۰۱).

جدول۱: ترکیب خوراک روزانه برای هر اسبچه خزر

صبح	ظهر	عصر
یونجه ۱ کیلوگرم	یونجه ۱ کیلوگرم	یونجه ۱ کیلوگرم
کاه یا کلش	کاه یا کلش	کاه یا کلش
۰/۵کیلوگرم	۰/۵کیلوگرم	۰/۵کیلوگرم

برای ارزیابی ویتامینE و ویتامینC نمونه‌های خون به آزمایشگاه تحقیقاتی بیوفارماسی پارس واقع در تهران انتقال داده شده و سرم ارسالی به آزمایشگاه توسط دستگاه HPLC[2] انجام شد. بدین‌منظور ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما، ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول اضافه می‌شود، در میکسر به‌مدت ۲۰ ثانیه قرار داده شد و سپس به‌مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ (۴۰۰۰ RPM) قرار داده شد. سپس از محلول بالایی ۱ میلی‌لیتر را برداشته و در لوله آزمایش قرار داده شد و ۱ میلی‌لیتر هگزان و ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه نموده و مجدداً به‌مدت ۲۰ ثانیه در شیکر و دوباره ۵ دقیقه در سانتریفیوژ (۴۰۰۰ RPM) قرار داده شد. دوباره از محلول بالایی ۷۵۰ میکرولیتر برداشته و با هگزان استخراج می‌نمایند. هگزان را زیر گاز ازت تبخیر نموده و به باقی‌مانده که در لوله است ۲۵۰ میکرولیتر متانول اضافه کرده و ۷۰ میکرولیتر به HPLC تزریق می‌نمایند (Williams و همکاران، ۲۰۰۴). برای اندازه‌گیری آنزیم‌هایAST، CK، GSH و SOD سرم‌های خون جمع‌آوری شده، در دمای ۲۰- درجه فریز شده و به آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه تهران ارسال شد. در آزمایشگاه با استفاده از کیت ELITech (CK

[1] ویتامین **E** مورد استفاده در این آزمایش از نوع DL-alpha-Tocopherol acetat ۵۰ درصد بود.

[2] - Instrument,HPLC Pump,; Young Lin Gradient pump. SP۹۳۰D-Detector,; Young Lin UV۷۳۰D-Injection Valve,; Rheondyne ۷۱۲۵i

(NAC ۵+۱ و به‌روش اتانالایزر و برحسب U/L آنزیم‌های CK و AST اندازه‌گیری شدند (Frankel وReitman، ۱۹۵۷) و آنزیم‌های GSH و SOD با استفاده از کیت Biorex diagnostics (GLUTATHIONE PEROXIDASE) و به‌روش اسپکتوفتومتر و برحسب U/L اندازه‌گیری شدند (Szasz و همکاران، ۱۹۷۶).

طرح آماری: در پایان داده‌های به‌دست آمده برای به‌دست آوردن اثرات اصلی (قبل و بعد از تست ورزش) و افزودنی (بدون افزودنی، استفاده از ویتامین C، E و اثرات توام آن‌ها) با برنامه آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای تنظیم و دسته‌بندی داده‌ها از نرم‌افزار کامپیوتری Excel و مقایسات میانگین‌ها، با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

نتایج

در جدول ۲ پارامترهای مربوط به هفته سوم قبل از تمرین نمایش داده شده است. آنزیم آسپارتات‌آمینوترانسفراز(AST)، آنزیم کراتین کیناز (CK)، آنزیم گلوتاتیون‌پراکسیداز(GSH) و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند (p≥۰/۰۵). سطح ویتامین C سرم تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت(p≥۰/۰۵). در مورد ویتامین Eاختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده شده‌است (p≤۰/۰۵) و بیش‌ترین مقدار سطح سرمی ویتامین E مربوط به تیمار آزمایشی دریافت کننده ویتامین‌های E+C و کم‌ترین مقدار مربوط به تیمار آزمایشی شاهد می‌باشد.

جدول۲: پارامترهای مربوط به هفته سوم قبل از تمرین

صفت / تیمارآزمایش	AST	CK	GSH	SOD	VitC	VitE
شاهد	۱۹۹/۰۰۰۰	۲۴۲/۶۶۶۷	۴۸/۴۳۳۳	۱۳۳۳/۸۳۶۷	۱/۴۱۶۷	۰/۹۴۰۰[a]
ویتامین E واحد بین‌المللیIU بر کیلوگرم وزن	۲۰۳/۰۰۰۰	۴۶۷/۳۳۳۳	۶۴/۰۳۳۳	۹۷۶/۳۰۰۰	۱/۳۲۶۷	۱/۳۹۰۰[a]
ویتامین C گرم بر وزن	۱۹۳/۰۰۰۰	۴۱۳/۶۶۶۷	۴۲/۵۵۰۰	۱۱۴۲/۵۳۶۷	۱/۰۳۰۰	۱/۴۵۶۷[a]
ویتامین E+C	۱۹۵/۰۰۰۰	۲۴۵/۶۶۶۷	۳۸/۰۵۶۷	۱۳۱۶/۳۳۳۳	۱/۴۲۰۰	۲/۴۶۳۳[b]
SEM	۴/۱۲۵۸۶	۷۴/۸۵۱۴۰	۱۴۹/۱۶۸	۷۳/۶۳۷۴۴	۰/۰۷۳۸۳	۰/۲۱۰۵۰
P-Value	۰/۸۷۴	۰/۶۸۳	۰/۴۳۱	۰/۲۹۶	۰/۱۹۹	۰/۰۳۶

میانگین‌های هر ستون که علائم متفاوت دارند، از نظر آماری اختلاف معنی‌دار در سطح (p≤ ۰/۰۵) دارند.

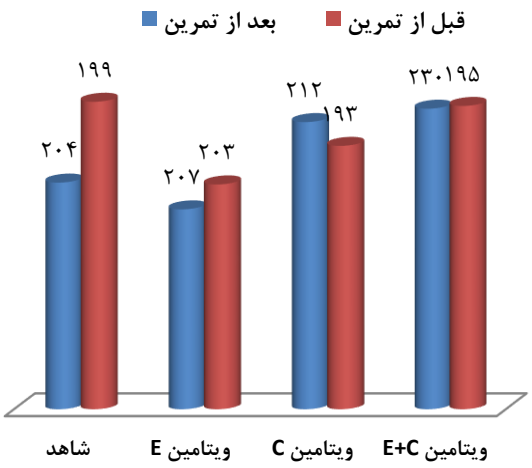
در جدول ۳ پارامترهای مربوط به هفته سوم بعد از تمرین، بیانگر این مطلب است، که آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، دارای اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی نمی‌باشد (P≥۰/۰۵). در مورد آنزیم کراتین‌کیناز (CK) اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده شده است (P≤۰/۰۱) که بیش‌ترین میزان آنزیم CK در تیمار آزمایشی شاهد و کم‌ترین میزان آنزیم در تیمار آزمایشی دریافت‌کننده ویتامین‌های E+C بوده است. در مورد آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز(GSH) و آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) اختلاف معنی داری مشاهده نشده است. در مورد ویتامین C اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشده است (P≥۰/۰۵). در مورد ویتامین E اختلاف معنی‌داری در تیمارهای آزمایشی مشاهده شده‌است (P≤۰/۰۵)، بیش‌ترین مقدار میانگین ویتامین E مربوط به تیمار آزمایشی دریافت کننده ویتامین‌های E+C و کم‌ترین مقدار مربوط به تیمار آزمایشی شاهد بوده است.

در شکل‌های ۱ تا ۶، نمودار تغییرات قبل و بعد از تمرین هریک از فاکتورها به‌طور جداگانه ترسیم شده است.

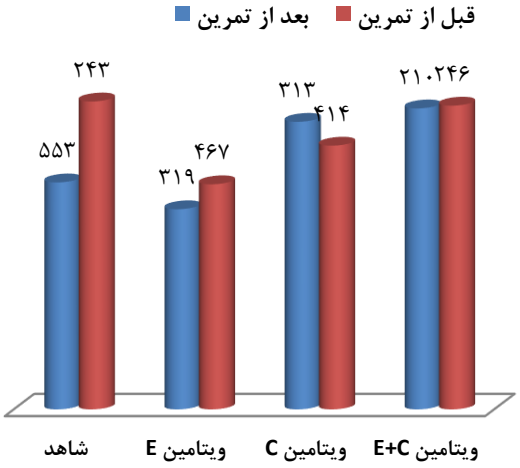
جدول ۳: پارامترهای مربوط به هفته سوم بعد از تمرین

صفت / تیمارآزمایش	AST	CK	GSH	SOD	VitC	VitE
شاهد	۲۰۴/۳۳۳۳	۵۵۲/۶۶۶۷[b]	۵۴/۹۵۳۳	۹۸۳/۸۳۶۷	۱/۰۶۰۰	۰/۸۳۶۷[a]
ویتامین E واحد بین‌المللیIU بر کیلوگرم وزن	۲۰۷/۳۳۳۳	۳۱۹/۳۳۳۳[a]	۵۲/۴۳۳۳	۸۶۷/۷۸۰۰	۱/۰۳۰۰	۱/۵۲۶۷[ab]
ویتامین C گرم بر وزن	۲۱۲/۳۳۳۳	۳۱۳/۰۰۰۰[a]	۴۲/۱۲۰۰	۱۲۴۵/۰۶۶۷	۰/۸۵۰۰	۱/۴۳۳۳[ab]
ویتامین E+C	۲۳۰/۵۰۰۰	۲۱۰/۰۰۰۰[a]	۵۰/۱۱۶۷	۱۳۰۳/۴۳۶۷	۱/۳۶۶۷	۲/۲۱۳۳[b]
SEM	۵/۵۳۲۹۰	۴۲/۰۱۲۸۳	۵/۴۷۷۶۳	۸۹/۷۴۷۳۵	۰/۸۶۲۴	۰/۱۸۹۷۲
P-Value	۰/۳۸۵	۰/۰۰۳	۰/۸۹۳	۰/۲۷۷	۰/۲۰۱	۰/۰۵۱

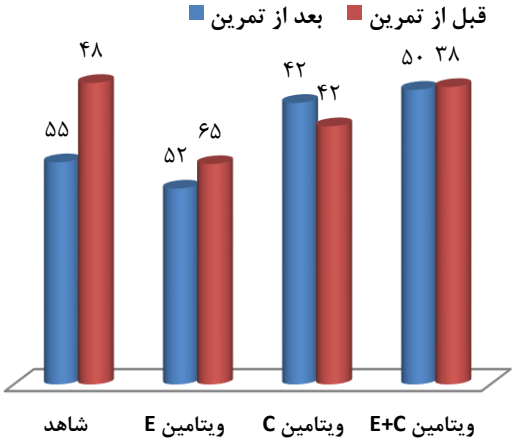
میانگین‌های هر ستون که علائم متفاوت دارند، از نظر آماری اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ دارند.



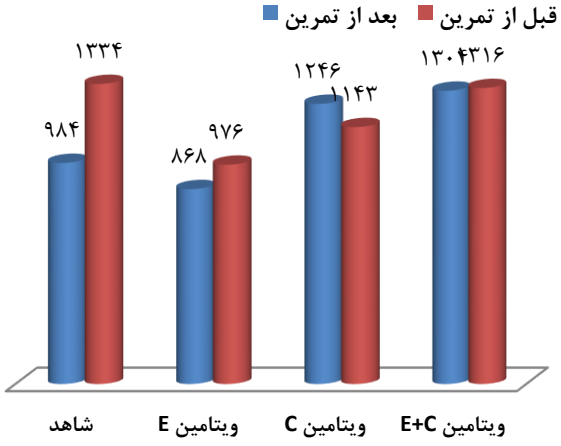
شکل۱: نمودارتغییرات آسپارتات‌آمینوترانسفراز در۴ گروه



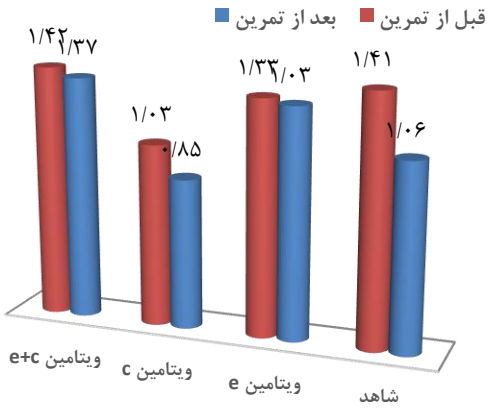
شکل ۲: نمودار تغیرات کراتین کیناز در ۴ گروه



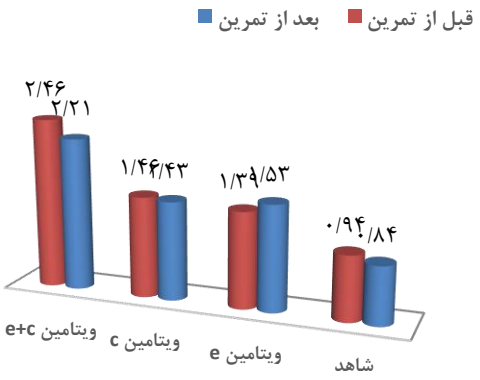
شکل ۳: نمودار تغییرات گلوتاتیون پراکسیداز در ۴ گروه



شکل ۴: نمودار سوپراکسیددیسموتاز در ۴ گروه



شکل ۵: نمودار تغییرات ویتامین C در ۴ گروه



شکل ۶: نمودار تغییرات ویتامین E در ۴ گروه

بحث

آنزیم‌هایی مانند SOD و GSH و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند Vit E، معمولاً از بافت‌ها در مقابل تخریب اکسیداتیو محافظت نمی‌کنند (Michiels و همکاران، ۱۹۹۴؛ Chow، ۱۹۹۱؛ Halliwell و Gutteridge، ۱۹۹۰)، اما این سیستم آنتی‌اکسیدانی افزایش تخلیه قسمتی از، گونه‌های فعال اکسیژن واکنش دهنده با اجزاء سلولی را در زمان آسیب پذیری بافتی بر عهده دارند. اگرچه به‌نظر می‌رسد که بافت‌ها زمانی‌که در فعالیت‌های سخت و شدید قرار می‌گیرند، دفاع آنتی‌اکسیدانی خود را افزایش می‌دهند (Piccion و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین اعمال و اجرای برنامه‌های آموزشی مشخص می‌تواند، با تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی در برابر ضایعات به‌وجود آمده در اثر تمرینات بدنی، راه رسیدن به قهرمانی را هموار نماید (Chiaradia و همکاران، ۱۹۹۸). نتایج حاصله از این تحقیق با نتایج آزمایش (Piccion و همکاران، ۲۰۰۷) که مقدار کراتین‌کیناز (CK) در سرم خون ۶ رأس اسب تروبرد مورد بررسی قرار دادند، مطابقت ندارد ($P\leq ۰/۰۵$).

از طرف دیگر آمار دقیق و قابل ملاحظه‌ای برای تغییرات کراتین‌کیناز (CK) در دسترس نیست، ولی به‌نظر می‌رسد که به‌دلیل از بین بردن یا کاهش طغیان ضایعات ماهیچه‌ای ایجاد شده در اثر استرس اکسیداتیو ناشی از ورزش باشد. در خلال تمرینات بدنی در اسب‌ها، یک نوع حالت افزایش کراتین‌کیناز (CK) وجود دارد، که این افزایش لزوماً در اثر کمبود تمرینات مستمر یا خستگی ماهیچه‌ایی ایجاد نمی‌شود (Kirschvink، ۲۰۰۸).

نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج آزمایش (Hoffman و همکاران، ۲۰۰۱) در مورد کراتین‌کیناز (CK) و آسپارتات‌آمینوترانسفراز (AST) در انتهای دوره آزمایش مطابقت دارد. ویتامین E ساکن در چربی‌های غشاء در درجه اول اثر محافظتی روی آسیب‌های ماهیچه‌ای ناشی از ورزش در انسان و اسب دارد و این شاید به‌دلیل کمک کردن به ممانعت از به‌وجود آمدن پراکسیداسیون لیپیدی باشد.

Wlliams و همکاران (۲۰۰۸) در تحقیق بر روی ۴۶ رأس اسب (شامل ۳۵ رأس اسب عرب، ۹ رأس اسب دو خون عرب، ۱ رأس اسب تروبرد و ۱ رأس اسب گرید تایپ) با جیره غذایی یکسان، تأثیر مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی vit C و vit E بر استرس اکسیداتیو مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد، آنتی‌اکسیدان‌ها در تشکیل آنزیم گلوتاتیون پروکسیداز نقش دارند (که مطابق با نتایج این تحقیق می‌باشد).

در تحقیق Williams و همکاران (۲۰۰۴)، آزمایشی بر پلاسمای خون روی فاکتورهای خونی چربی هیدروپروکسیداز، α توکوفرول، اسید اسکوربیک، آلبومین، کراتین‌کیناز(CK) و آسپارتات‌آمینوترانسفراز (AST) صورت گرفت، نتایج نشان داد، ویتامین C در گروه E+C معنی‌دار شد و مقدار ویتامین C بیش‌تر از گروه ویتامین E بود. نتایج نشان‌دهنده این است که آسیب ماهیچه‌ای در نتیجه آزاد شدن رادیکال‌های آزاد در اثر استرس اکسیداتیو صورت گرفته و مصرف ویتامین E به‌همراه ویتامین C تأثیر بیش‌تری بر روی کاهش تخریب استرس اکسیداتیو در اسب‌های مسابقه‌ای دارد. در تحقیقات پیشین نشان داده شده است به اندازه ۳۰۰ واحد بین‌المللیIU بر کیلوگرم وزن ویتامین E به‌صورت روزانه برای ثابت نگه‌داشتن وضعیت مناسب بدنی و به‌صورت α-توکوفرول در کنسانتره جیره اسب‌های ورزشی ضروری است (Sissilliano و همکاران، ۱۹۹۷).

در تحقیق دیگری که Balaskonis و همکاران (۲۰۱۰) در آمریکا بر روی اسب‌های استاندارد برد انجام دادند، بعد از گرفتن نمونه‌های خونی و آزمایش بر روی پلاسمای آن‌ها دریافتند که، مصرف ویتامینE تأثیر به‌سزایی در کاهش تخریب اکسیداتیو در عضله اسب‌ها داشته است (مطابق با نتایج این تحقیق است). در تحقیقی اضافه کردن ویتامین E در جیره غذایی روزانه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در کاهش استرس اکسیداتیو در اسب‌های که تحت ورزش شدید قرار داشتد، تاثیر به‌سزایی داشت (Duberstein و همکاران، ۲۰۰۸).

نتیجه تحقیقی در آمریکا، در مورد تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها در کاهش تخریب اکسیداتیو، با استفاده از ویتامین E و سلنیوم، نشان داد که سلنیوم در افزایش جذب ویتامین E مؤثر است بوده و باعث کاهش اثر تخریب استرس اکسیداتیو (رادیکال‌های آزاد) می‌شود (Richardson و همکاران، ۲۰۰۵).

در تحقیقاتی مشابهی که انجمن مطالعه اسب در انگلستان، گروه تحقیقاتی کالج ویرجینیا انجام شد، حاکی بر اثر مثبت ویتامین E بر کاهش تخریب اکسیداتیو بوده است. در تحقیق MCMenimarl و Hintz (۱۹۹۲) در آمریکا مبنی بر اثر ویتامین E بر روی پروکسید چربی در ورزش اسب‌های نتیجه مشابهی حاصل شد. طبق نتایج McBrideو Kraemer(۱۹۹۹) وJeffcottو Kohn (۱۹۹۹) در استرالیا، ویتامین E نقش به‌سزایی در کاهش آثار تخریبی رادیکال‌های آزاد در ماهیچه‌های اسب‌های ورزشی دارند. این نتایج نشان‌دهنده این است، که آسیب ماهیچه‌ای و تجمع رادیکال آزاد در اثر استرس اکسیداتیو صورت گرفته است. زمانی‌که مجموع آنتی‌اکسیدان‌ها کافی نباشد، اکسیداتیو پروکسیداز می‌تواند به DNA آسیب برساند، بر روی لیپیدها تأثیر می‌گذارد و در تغییرات اصلی که شامل از بین بردن سلول‌ها یا پیری زودرس و سرطان می‌باشد، شرکت می‌کند (Harman و Piette، ۱۹۶۶). چربی‌ها مستقیماً به‌وسیلهٔ α توکوفرال، در مجاورت غشاء و به‌وسیله بقیه آنتی‌اکسیدان‌ها، که شامل اسیداسکوربیک می‌شوند، جمع‌آوری می‌گردد (Chan، ۱۹۹۳).

نتایج حاصله از این تحقیق نمایانگر تأثیر به‌سزای استفاده از ویتامین‌های E وC در کاهش آنزیم‌های AST، CK، GSH و SOD بعد از تمرین شدید ورزشی می‌باشد. در این تحقیق تأثیر ویتامین‌های E، C و ترکیبی از این دو در کاهش تنش‌های اکسیداتیو در اسبچه‌های خزر تحت آزمایش اثبات گردید. مکمل‌سازی با ویتامین‌های E و C می‌تواند وضعیت α توکوفرول و اسیداسکوربیک را در پونی‌های ورزش چوگان، بهبود بخشد، به‌خصوص در انتهای فصل مسابقه و زمانی‌که تمرینات طبق برنامه بیش از حد باشد. به‌طورکلی پونی‌های با فعالیت ورزشی شدید در مقایسه با گروهی با فعالیت ورزشی سبک، می‌توانند از مکمل‌های ویتامین E و C بهره بیش‌تری ببرند و کارآیی را در اسبان با فعالیت ورزشی سنگین بهبود می‌بخشد (Hoffman و همکاران، ۲۰۰۱).

منابع

۱. **غزنوی،ر.؛ کدخدایی، م.؛ خواستار. ح. و زحمتکش. م.، ۱۳۸۵.** استرس اکسیداتیو و تغییرات هیستولوژی کلیه در نفروتوکسیسیتی ناشی از جنتامایسین: اثرویتامین‌های آنتی‌اکسیدان. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران. دوره ۶۴، شماره ۵، صفحات ۱۵ تا ۲۲ .

۲. **گاتریج، ج.م.س.، ۱۳۷۸.** آنتی اکسیدان ها در تغذیه، سلامت و بیماری. رشیدی، آ. کاراندیش، م. تهران: نشر علوم کشاورزی، صفحات ۷ تا ۲۱، ۳۵ تا ۱۰۹.

۳. **میشل، م.، ۱۳۷۷.** درمان طبیعی، جایگزین‌های طبیعی برای داروهای شیمیایی. ترجمه، دکتر عبدالرحیم گواهی. تهران: نشر فرهنگ اسلامی، صفحات ۳۲ تا ۴۰، ۵۸ تا ۵۹، ۱۱۰ تا ۱۱۵، ۱۳۶ تا ۱۴۱، ۱۷۰، ۱۷۱، ۲۳۶، ۲۳۷.

۴. **Balaskonis, V.; Szucsik, A.; Lehnhard, H. and Kenneth, H.M., ۲۰۱۰.** Effect of dietary supplements commonly used in standard bred racing on plasma total carbon dioxide. Department of Animal Science, Equine Center, Rutgers, the state University of New Jersey, New Brunswick. NJ, USA.

۵. **Burton, G.W.; Joyce, C. and Ingold, K.U., ۱۹۸۲.** First proof that vitamin E is major lipid soluble, chain breaking antioxidant in human blood plasma. Lancet. Vol. ۲, ۳۲۷ p.

۶. **Burtan, G.W., and Ingold, K.U., ۱۹۸۹.** Vitamin E asan invivo and invitro antioxidant Annals of the New York academy of science. Vol. ۵۷۰, pp: ۷-۲۲.

۷. **Conchranc, C.G., ۱۹۹۷.** Cellular injury by oxidants Amj med. Vol. ۹۲, pp: ۲۳۵-۲۵۵.

۸. **Chan, A.C., ۱۹۹۳.** Partners in defence, vitamin E and vitamin C. Can. J. physiol. Pharmacol. Vol. ۷۱, pp: ۷۲۵-۷۳۱.

۹. **Chow, C.K., ۱۹۹۱.** Vitamin E and Oxidative stress. Free Radical. Biol. Med. Vol. ۱۱, pp: ۲۱۵-۲۳۲.

۱۰. **Chiaradia, E.L.; Avellini, F.; Rueca, A.; spaterna, F.; Brciello, M.T.; Antonioni, S. and Gaiti, A., ۱۹۹۸.** Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in race horses. Comp.Biodem. physiol. Vol. ۱۱۹, pp: ۸۳۳-۸۳۶.

۱۱. **Deaton, C.M., ۲۰۰۶.** The role of oxidative stress in an equine model of human asthma. Redox report, Communication in Free radical research. Vol. ۱۱, pp: ٤٦-٥٢.

۱۲. **Deaton, C.M.; Marlin, D.J.; Roberts, C.A., ۲۰۰۲.** Antioxidant supplementation and pulmonary function at rest and exercise. Eq Vet J Suppl. Vol. ۳٤, pp: ٥٨-٨٥.

۱۳. **Duberstein, K.Y.; Johnson, S.E. and Owell, M.C.D., ۲۰۰۸.** Protein carbonyl assay to oxidative stress in muscle of exercising horses supplement with vitamin E, Department of Animal sciences University of Florida, Gainesville, FL۳۲٦۱۱, USA.

۱۴. **Fenster, R., ۱۹۸۹.** Vitamin C and stress management in poultry production, Zootec. Int. pp: ١٦-٢٠.

۱۵. **Halliwell, B.; Gutteridge, G.M. and John, M.C., ۱۹۹۹.** Free radicals in Biology and medicine: third end Oxford University. Chapter ۷, ۸.

۱۶. **Halliwell, B. and Gutteridge, G.M., ۱۹۹۰.** The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys. Vol. ٢٦٠, pp: ١-٨.

۱۷. **Harman, D. and Piette. L.H., ۱۹٦٦.** Free ratical theory of aging: free radical reactions in serum. J Gerontol. Vol. ۲۱, pp: ٥٦٠-٥٦٥.

۱۸. **Hoffman, R.M.; Morgan, K.L.; Philips, A.; Dinger, J.E.; Zinn, S.A. and Faustman, C., ۲۰۰۱.** Dietary vitamin E and Ascorbic Acid influence nutritional status of exercising Polo Ponies, Equine Nutr. Physiol. Symposium. Vol. ۱۷, pp: ١٢٩-١٣٠.

۱۹. **Inoue, B. and kawanishi, S., ۱۹۹۵.** Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric-oxide and superxide. FEBS Lett. Vol. ۳۷۱, pp: ٨٦-٨٨.

۲۰. **Jeffcott, L.B. and Kohn, C.W., ۱۹۹۹.** Contributions of equline exercise physiology research to the success of the ١٩٩٦ Equestrian Olympic Games. Areview. Equine Vet. J. supple. Vol. ۳۰, pp: ٣٤٧-٣٥٥

۲۱. **Karamanlioglu, B., ۲۰۰۲.** Hepatobiliary scintigraphy for evaluating the hepatooxic effects of halothance and protective effect of catechin in comparison with histon chemical analysis of liver tissue nuct Med commun jon. Vol. ۲۳, No. ۱, pp: ٥٣-٩.

۲۲. **Kirschvink, N., ۲۰۰۸.** The oxidant / antioxidant equilibrium in horses. The Veterinary Journal. Vol. ۱۷۷, No. ۲, pp: ١٧٨-١٩١.

۲۳. **McBride, I.M. and Kraemer, W.I., ۱۹۹۹.** Free radicals, exercise and antioxidants. J. Strenght Cond. Res. ۱۳.pp:١٧٥-١٨٣.

۲۴. **MC Menimarl, N.P. and Hintz, H.F., ۱۹۹۲.** Effect of vitamin E status on lipid peroxidation in exercised horses. Equine vet. J. Vol. ٢٤, pp: ٤٨٢-٤٨٤.

۲۵. **Mastronardi, C.A.; and Yuw, H., ۲۰۰۱.** Comparisons of the anesthesia and stress on release of tumor necrosis factor-alpha leptin, and nitric oxide in adult male rats. Exp Biol med (way wood). Vol. ٢٢٦, No. ٤, pp: ٢٩٦-٣٠٠.

۲۶. **Michiels, C.M.; Raes, O. and Remacle, J., ۱۹۹٤.** Importance of Seglutathione peroxidase catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. Vol. ١٧, pp: ٢٣٥-٢٤٨.

۲۷. **Piccione, G.: Fazio, F.; Giannetto, C.; Assenza, A. and Caola, G., ۲۰۰۷.** Oxidative stress in thoroughbreds during official ١٨٠٠-metre races. Vet. Vol. ٧٧, pp: ٢١٩-٢٢٧.

۲۸. **Reitman, S. and Frankel, A.S., ۱۹۵۷.** Acolorimetric method for the determination of serum glutatmic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases American Journal of Clinical Patthology. Vol. ٢٨, pp: ٥٦-٦٣.

۲۹. **Siciliano, P.D.; Parker, A.L. and Lawrence, L.M., ۱۹۹۷,** Effect of dietary vitamin E supplementation on the integrity of

skeletal muscle in exercised horses. J. Anim. Sci. Vol. ۷۵, pp: ۱۵۵۳-۱۵۶۰.

۳۰. **Szasz, G.; Gerhardt, W.; Gruber, W. and Bernt, E., ۱۹۷۶.** Creatine Kinase in serum. ۲. Interference of adenylate kinase with the assay. Clin. Chem. Vol. ۲۲, pp: ۱۸۰۶-۱۸۱۲.

۳۱. **Thaler, W.; Frey, L.; Marzoli, G.P. and Messmer, K., ۱۹۹۶.** Assessment of splanchnic tissue oxygenation by gastric tonometry in patients undergoing laparoscopic and open cholecystectomy. Brj surg. Vol. ٦۳, No. ٥, pp: ٦۲۰-٤.

۳۲. **Williams, C.A.; kronfeld, D.S.; Hess, T.M.; Waldron, J.N.; Hoffman, M.J. and Harris, P.A., ۲۰۰٤.** Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an ۸۰-km endurance race /Animal Science. Vol. ۸۲, pp: ٥۸۸-٥۹٤.

۳۳. **Williams, C.A.; Gordon, M.E.; Betro, C.L. and McKeever, K.H., ۲۰۰۸**, Apoptosis and antioxidant status are influenced by age and exercise training in horses/ Journal of Animal Science. Vol. ۸٦, pp: ٥۷٦-٥۸۳.

۳۴. **Wrang, X. and Quinn, P.J., ۲۰۰۰**.The location and function of vitamin E in membranes (review). Mol Membr Biol. Vol. ۱۷, pp: ۱٤۳-۱٥٦.

۳۵. **Yug, B.P., ۱۹۹٤**. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev. Vol. ۷٤, pp: ۱۳۹-۱٦۲.