

مقایسه اثرات ۲- فنوکسی اتانول، عصاره گل میخک و PI222 به عنوان مواد بیهوشی بر میزان گلوکز و هورمون کورتیزول پلاسمای خون در ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)

سمیه تجار^۱، مژگان خدادادی*^۲، مهران جواهری^۲

۱- گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات خوزستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران، صندوق پستی: ۱۴۵۱۵/۷۷۵

۲- گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران، صندوق پستی: ۱۹۱۵

تاریخ پذیرش: ۹ اسفند ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۱ آبان ۱۳۹۴

چکیده

افزایش نیاز کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهی به استفاده از بیهوش‌کننده‌ها، مطالعه تأثیر بیهوش‌کننده‌های جدید را به منظور جایگزینی و معرفی یک ماده با کم‌ترین آسیب و استرس به ماهی را طلب می‌کند. در این مطالعه به بررسی اثرات سه ماده بیهوشی ۲- فنوکسی اتانول، عصاره گل میخک و PI222 بر شاخص‌های استرس (گلوکز و هورمون کورتیزول) در ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) پرداخته شده است. ابتدا ۱۲۰ عدد ماهی با بهترین دوز هریک از مواد بیهوشی (بر این اساس که بیهوشی را در کم‌تر از ۳ دقیقه و ریکاوری را در کم‌تر از ۵ دقیقه ایجاد کند) (۲- فنوکسی اتانول ۳۰۰ قسمت در میلیون، عصاره گل میخک و PI222 ۵۰ قسمت در میلیون) بیهوش و سپس در زمان‌های ۰، ۶ و ۲۴ ساعت بعد از ریکاوری مورد خونگیری قرار گرفتند و میزان گلوکز و هورمون کورتیزول آن‌ها جهت تعیین میزان استرس وارده در حین بیهوشی مورد بررسی هماتولوژیک قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۲- فنوکسی اتانول باعث افزایش معنی‌دار گلوکز ($P < 0.05$) گردید و به عنوان ماده بیهوش‌کننده استرس‌زا و عصاره گل میخک و PI222 به دلیل عدم تغییرات معنی‌دار در این شاخص‌ها به عنوان بیهوش‌کننده‌های مناسب تشخیص داده شدند.

کلمات کلیدی: بیهوشی، استرس، *Hypophthalmichthys molitrix*، ۲- فنوکسی اتانول، عصاره گل میخک، PI222.

مقدمه

خانواده کپورماهیان بزرگ‌ترین خانواده ماهیان استخوانی و یکی از مهم‌ترین خانواده‌های ماهی‌های آب شیرین است. مهم‌ترین ماهی‌های پرورشی گرم آبی از جمله کپور نقره‌ای یا فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) متعلق به این خانواده هستند و تقریباً در همه حوضه‌های آبی ایران یافت می‌شوند (کیوانی، ۱۳۸۷). در ایران پرورش کپورماهیان یکی از فعالیت‌های قدیمی و از زیربخش‌های مهم شیلات محسوب می‌شود. کپور نقره‌ای که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته، یکی از با ارزش‌ترین ماهیان پرورشی این خانواده می‌باشد که پرورش آن کاملاً اقتصادی و مقرون به صرفه می‌باشد (وثنوقی و مستجیر، ۱۳۸۵).

توسعه روزافزون آبی پروری در بسیاری از مناطق دنیا منجر به افزایش درخواست به کارگیری و استفاده از مواد شیمیایی جدید شده است. از جمله ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در آبی پروری مواد بیهوش کننده هستند که در عملیات تشخیص و معاینات بهداشتی، تکثیر مصنوعی، کاهش استرس در زمان حمل و نقل، انجام مطالعات تحقیقاتی، در هنگام تخم‌کشی، جراحی و هر عملیاتی که همراه با درد باشد جهت آرام کردن یا بیهوشی استفاده از داروهای بیهوشی، اجتناب ناپذیر است (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۰). از جمله مواد بیهوشی مورد استفاده برای آبیان تریکائین متان سولفات (MS222)، بنزوکائین، کینالدین، ۲- فنوکسی اتانول، متومیدات، اتومیدات و گل میخک و.... را می‌توان نام برد. مواد بیهوشی مناسب در آبی پروری باید ویژگی‌های متعددی را دارا باشند که از آن جمله می‌توان به

ایجاد سریع بیهوشی، ریکاوری سریع، غیر سمی بودن برای ماهی و انسان و محیط زیست، نداشتن اثرات سوء فیزیولوژیک و در دسترس بودن و ارزان بودن آن اشاره کرد (مهرابی، ۱۳۷۶). تحقیقاتی نیز در مورد این مواد صورت گرفته است از جمله اثرات بیهوشی اسانس گل میخک را بر پارامترهای هماتولوژیک، برخی آنزیم‌های خون و آسیب شناسی بافت‌های مختلف ماهی کپور معمولی مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که مصرف اسانس گل میخک تا ۲۰۰ قسمت در میلیون به عنوان ماده بیهوشی در آبی پروری بی خطر و قابل توصیه است (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۳). اثرات بیهوشی با عصاره گل میخک بر ترکیب خونی ماهی طلایی (*Crassius auratus*) که نشان داد بیهوشی تا غلظت ۷۵ قسمت در میلیون اثرات غیر قابل برگشت و عوارضی برای ماهی طلایی ندارد (Abdolazizi et al., 2011). مقایسه تأثیر بیهوشی با دی‌اکسید کربن، عصاره گل میخک و کشتار خارج از آب بر گوشت ماهی کپور معمولی، که نشان داد ماهی بیهوش شده با عصاره گل میخک کیفیت گوشت به مراتب بالاتری نسبت به سایر تیمارها دارد (رحمانی فرح و همکاران، ۱۳۸۹). همچنین دوز مناسب ۲- فنوکسی اتانول، در ماهی سیم خط طلایی (*Sparus sarba*) ۴۰۰ قسمت در میلیون (Hseu et al., 1998) و در ب‌اس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) ۳۵۰ قسمت در میلیون و در سیم سر طلایی (*Sparus aurata*) ۳۰۰ قسمت در میلیون تعیین شد و غلظت ۴۰ ppm قسمت در میلیون نیز برای عصاره گل میخک در ب‌اس اروپایی و سیم سر طلایی ذکر شد (Mylonas et al., 2005).

عصاره گل میخک و PI222 و دو-فنوکسی اتانول به عنوان مواد بیهوش کننده مورد بررسی در این مطالعه با توجه به در دسترس بودن و رایج بودن در کشور و همچنین ارزان و بی خطر بودن برای ماهی، کاربر و محیط زیست انتخاب شدند. عصاره گل میخک به عنوان یک ماده بی خطر شناخته شده عمومی توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) برای استفاده جهانی معرفی شده است. دو-فنوکسی اتانول نیز یک مایع معطر روغنی بی رنگ با بو و طعم سوختگی است و قابلیت انحلال در آب آن ۲۷ گرم برلیتر در ۲۰ درجه سانتی گراد است و به عنوان یک بیهوش کننده موضعی اغلب مورد استفاده قرار می گیرد (Merck and Company, 1989). PI222 یک ماده بیهوش کننده جدید و کاملاً طبیعی است که توسط شرکت پارس ایمن دارو با نام تجاری پی - آی - ۲۲۲ (به لحاظ تولید در شرکت پارس - ایمن - دارو) تولید گردیده است که یک ترکیب صد در صد گیاهی است. بوی نافذ و طعمی تند مزه و ادویه ای دارد. رنگ آن قهوه ای روشن بوده و به سهولت در آب حل می شود. این ترکیب فاقد هر گونه سمیت و عوارض جانبی است. پی - آی - ۲۲۲ فاقد دوره پرهیز مصرف است و به هیچ وجه سبب آلودگی محیط زیست نمی شود. مهم ترین مواد تشکیل دهنده پی - آی - ۲۲۲ را کارواکرول، تیمول، اوژنول، اوژنیل استات، کاریوفیلین، هومولن، اکسید کاریوفیلین تشکیل می دهند.

از آنجایی که ترکیبات خون ماهی تحت تأثیر استرس های محیطی است، بیهوش کردن ماهی خود می تواند به عنوان یک استرس تلقی شود. در واقع بیهوشی خود به عنوان یک استرس بالقوه مطرح است. که در این صورت مجموعه ای از تغییرات مهم از جمله

افزایش ضربان قلب، افزایش تنفس، افزایش گلوکز و کورتیزول در واکنش به استرس رخ می دهد (رأس و راس، ۱۹۹۹). اثرات استرس اغلب زیان آور است، لذا اندازه گیری برخی از فاکتورهای سرم خون و هورمون های خونی نظیر کورتیزول و گلوکز برای سنجش میزان استرس احتمالی ناشی از مواد بیهوش کننده و بررسی تغییرات آنها، می تواند شاخصی از وضعیت سلامتی ماهی قلمداد شود و همچنین به عنوان معیاری برای سنجش مناسب بودن دارو مورد استفاده قرار گیرد. لذا بکارگیری ماده ای مناسب برای بیهوشی به جهت کاهش استرس و عوارض جانبی یکی از موارد مهم و با اهمیت می باشد (باورصاد الله داد، ۱۳۸۶).

مواد و روش ها

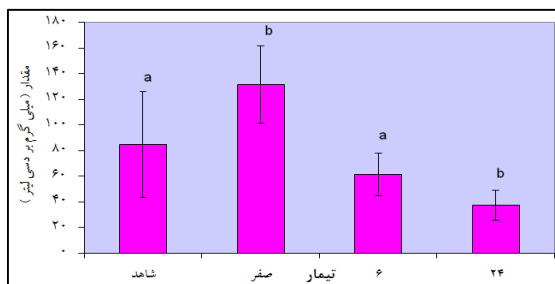
این بررسی در خرداد و تیرماه ۱۳۹۰ در مرکز تکثیر و پرورش آبزیان شوش واقع در ۹ کیلومتری جاده شوش - دزفول انجام شد. ۲۴۰ قطعه ماهی کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) نر و ماده با میانگین وزنی $39/51 \pm 20/66$ گرم و میانگین طول کل $1/62 \pm 26/79$ سانتی متر و میانگین طول استاندارد $1/31 \pm 22/85$ سانتی متر که از لحاظ ظاهری سالم بودند انتخاب گردید و به استخر سیمانی غنی از فیتوپلانکتون (جهت تغذیه ماهی در مدت سازگاری) در محیط باز با ابعاد 3×4 متر انتقال داده شد و به مدت دو هفته جهت سازگاری نگهداری گردید (Abdolazizi et al., 2011). فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب روزانه در زمان نگهداری ماهی ها و اجرای آزمایش اندازه گیری گردید و میانگین آنها ثبت شد. به این ترتیب که میانگین درجه حرارت آب $23 \pm 2/25$ درجه سانتی گراد و میزان اکسیژن آب $1/37 \pm 8/5$ میلی گرم بر لیتر و pH

آب برابر با ۷ ثبت گردید. شرایط سلامت ماهی از نظر ظاهری و شنای نرمال مورد بررسی قرار گرفت تا ماهی در شرایط استاندارد از نظر عدم وجود استرس‌های محیطی و عدم تغییر در عوامل فیزیکی و شیمیایی آب نگهداری شود. پس از سازگاری، ماهی‌ها در ۸ گروه ۳۰ تایی، برای مواد بیهوشی مورد مطالعه شامل ۲- فنوکسی اتانول، عصاره گل میخک، PI222 و گروه شاهد تقسیم شدند و به حوضچه‌های داخل سالن با ابعاد ۱×۱/۵×۱ متر انتقال و به مدت ۲۴ ساعت در این حوضچه‌ها نگهداری شدند. در این مدت تغذیه ماهی‌ها به منظور کاهش استرس و کاهش نیاز اکسیژنی در حین عملیات بیهوشی، قطع گردید (Sattari et al., 2009). هوادهی دائمی نیز برقرار بود. در این بررسی تعیین دوز مناسب برای سه ماده بیهوشی ۲- فنوکسی اتانول، عصاره گل میخک و PI222 در ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) بر این اساس که ماهی را در کم‌تر از ۳ دقیقه بیهوش کند و کم‌تر از ۵ دقیقه بازگشت از بیهوشی صورت گیرد طبق نظر Julin و Schoettger (۱۹۶۷)، صورت گرفت. هریک از مواد بیهوشی در ۴ دوز مختلف آزمایش گردید که در هر دوز ۱۰ عدد ماهی از نظر مدت زمان القاء بیهوشی و بازگشت از آن مورد بررسی قرار گرفت. عصاره گل میخک با مقادیر ppm ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ به نوبت در ظروف پلاستیکی تا حجم ۲۵ لیتر تهیه گردید (Abdolazizi et al., 2011) سپس ماده بیهوشی ۲- فنوکسی اتانول نیز در ۴ دوز مختلف با مقادیر ppm ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ و ۴۰۰ به نوبت تهیه شد (Mattson and Rippe, 1989). ماده بیهوشی دیگر با نام تجاری PI222 به عنوان یک ماده جدید در بیهوشی آبزیان از شرکت گیاهان دارویی پارس ایمن دارو (تهران-ایران)

تهیه گردید و در ۴ دوز مختلف با مقادیر ppm ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ تهیه شد و همانند مواد بیهوشی دیگر مورد آزمایش قرار گرفت و زمان‌های القاء بیهوشی و بازگشت از آن در دوزهای مختلف برای این ماده نیز ثبت گردید. به علت جدید بودن این ماده بیهوشی، برای تعیین محدوده دوزهای مورد آزمایش، با تکیه به روش آزمون و خطا این محدوده در نظر گرفته شد که با موفقیت همراه بود و دوز مناسب در همین محدوده قرار داشت. لذا بهترین دوز برای ۲- فنوکسی اتانول ۳۰۰ و برای عصاره گل میخک و PI222 نیز دوز ۵۰ قسمت در میلیون تعیین شد (تجار و همکاران، ۱۳۹۰).

جهت اندازه‌گیری میزان استرس ناشی از بیهوشی، مواد بیهوشی مورد بررسی با دوز تعیین شده تا حجم ۲۵ لیتر در ظروف پلاستیکی همراه با هوادهی تهیه شد. برای هر ماده بیهوشی ۳۰ عدد ماهی (در واقع برای هر ماده بیهوشی سه تیمار شامل زمان‌های خونگیری ۶، ۲۴ و ۱۰ ساعت بعد از ریکاوری تعیین شد که هر تیمار دارای ۱۰ تکرار بود) و برای گروه شاهد نیز ۳۰ عدد ماهی در نظر گرفته شد. ماهی‌ها در دوز مناسب بیهوش و سپس مورد ریکاوری قرار می‌گرفتند و بعد از ریکاوری نمونه‌گیری از خون انجام می‌گرفت. نمونه‌گیری از خون در ۳ نوبت (درمورد گروه شاهد ماهی‌ها بدون اینکه تحت تأثیر ماده بیهوشی قرار گیرند نمونه‌گیری شدند) صورت می‌گرفت. به این ترتیب که از هر تیمار ۶ عدد از ماهی‌ها به طور تصادفی بلافاصله بعد از ریکاوری یعنی در زمان صفر، خونگیری انجام شد. نوبت‌های بعدی خونگیری، ۶ ساعت بعد و ۲۴ ساعت بعد از ریکاوری انجام شد. خونگیری از ورید ساقه دم و با استفاده از سرنگ ۵ میلی آغشته به هپارین صورت گرفت. سپس نمونه خون به لوله آزمایش یکبار مصرف مخصوص دستگاه سانتریفیوژ تخلیه و با

میزان گلوکز در زمان صفر یعنی بلافاصله بعد از ریکاوری و کم‌ترین مقدار آن در زمان ۲۴ می‌باشد. بنابراین میزان گلوکز با گذشت زمان روند کاهشی داشته است. همچنین مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن مبین این است که گلوکز در زمان صفر اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارد. تیمار شاهد نیز با دو زمان ۰ و ۲۴ اختلاف معنی‌دار دارد. ولی با زمان ۶ اختلاف معنی‌دار ندارد. بنابراین تیمار ۰، ۲۴ و شاهد در سه گروه جداگانه قرار می‌گیرند و گروه ۶ در هر دو گروه ۲۴ و شاهد قرار می‌گیرد.



شکل ۱: میزان گلوکز پلاسمای خون ماهی کپورنقره‌ای در

تیمارهای مختلف ۲- فنوکسی اتانول.

*حروف انگلیسی متفاوت، بیانگر وجود اختلاف معنی‌داری است.

ب) تغییرات میزان کورتیزول خون

در بیهوشی با ۲- فنوکسی اتانول میزان کورتیزول خون در زمان‌های ۰ و ۶ و ۲۴ ساعت بعد از ریکاوری به ترتیب $140/16 \pm 455/83$ ، $120/91 \pm 285/66$ ، $383/83 \pm 100/57$ نانوگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد که اختلاف معنی‌داری نداشت ($P < 0/05$) (شکل ۲). بیش‌ترین میزان کورتیزول در زمان صفر و کم‌ترین مقدار آن مربوط به ۶ ساعت بعد از ریکاوری است. در نتیجه با گذشت زمان میزان کورتیزول کاهش یافته است و مجدداً در ۲۴ ساعت بعد افزایش داشته است

سرعت ۳۰۰۰ دور در ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. نهایتاً پلاسمای خون با سمپلر جداسازی شد و به میکروتیوب درپوش‌دار منتقل گردید و تا زمان انجام آزمایش‌های تعیین گلوکز و کورتیزول، در دمای ۱۸- درجه سانتی-گراد قرار گرفت (Sattari et al., 2009). برای تعیین مقدار گلوکز از روش آنزیماتیک و با استفاده از کیت گلوکز ساخت شرکت پارس آزمون (کرج-ایران) انجام شد (Sattari et al., 2009; Adetunji et al., 2008). برای تعیین کورتیزول نیز از روش الیزا و با استفاده از کیت‌های دیامترا ساخت کشور آلمان استفاده شد (Sattari et al., 2009; Sink et al., 2008). همچنین به منظور بررسی اختلاف معنی‌داری از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون دانکن با استفاده از نرم افزار SPSS 16 با سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. جهت رسم نمودار نیز نرم افزار Excel 2003 مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

نتایج تغییرات شاخص‌های استرس (گلوکز

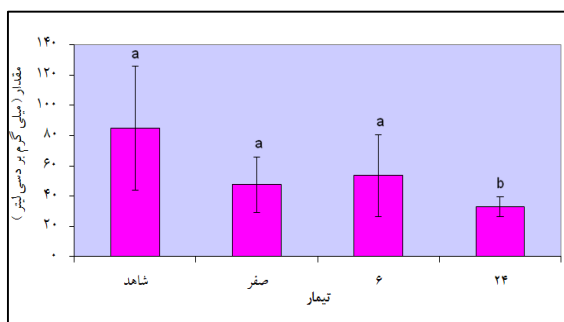
و کورتیزول) در ماهی کپورنقره‌ای بیهوش

شده با ۲- فنوکسی اتانول

الف) تغییرات میزان گلوکز خون

متوسط مقدار گلوکز تیمار شاهد $84/83 \pm 41/04$ میلی گرم بر دسی لیتر و در در هنگام نمونه‌گیری در زمان صفر، ۶ و ۲۴ ساعت بعد از ریکاوری به ترتیب $131/5 \pm 30/17$ ، $61/5 \pm 16/62$ ، $37/5 \pm 11/82$ میلی گرم بر دسی لیتر می‌باشد که در شکل ۱ نشان داده شده است. آنالیز واریانس این داده‌ها نشان می‌دهد که میزان گلوکز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری با هم دارد ($P < 0/05$). با توجه به شکل ۱ بیش‌ترین

همچنین در تمامی زمان‌ها سطح آن کم‌تر از سطح تیمارشاهد با مقدار $41/04 \pm 84/83$ میلی گرم بر دسی لیتر می‌باشد. همچنین مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن مبین این است زمان ۲۴ و تیمارشاهد باهم اختلاف معنی‌داری دارند. در نتیجه زمان ۲۴ و شاهد در گروه‌های جداگانه طبقه‌بندی می‌شوند ولی زمان ۰ و ۶ به همراه هم در هر دو این گروه‌ها جای می‌گیرند.

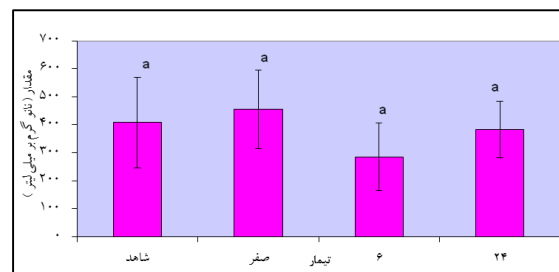


شکل ۳: میزان گلوکز پلاسمای خون ماهی کپور نقره‌ای در تیمارهای مختلف عصاره گل میخک

ب) تغییرات کورتیزول خون

در بیهوشی با عصاره گل میخک میزان کورتیزول خون در زمان‌های ۰ و ۶ و ۲۴ ساعت بعد از ریکاوری به ترتیب $66/33 \pm 291/5$ ، $99/77 \pm 421$ ، $110/28 \pm 382/83$ نانوگرم بر میلی لیتر اندازه‌گیری شد (شکل ۴). که این مقادیر در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری با هم ندارند ($P < 0/05$). در نتیجه، با توجه به شکل ۴ بیش‌ترین میزان کورتیزول مربوط به زمان ۶ می‌باشد. مقدار کورتیزول با گذشت ۲۴ ساعت از ریکاوری کم‌کم کاهش یافته است. کم‌ترین میزان نیز مربوط به زمان صفر می‌باشد. در تمامی زمان‌ها سطح کورتیزول از شاهد با مقدار $161/82 \pm 408/33$ کم‌تر است. همچنین طبق آزمون دانکن هیچ یک از تیمارها

(شکل ۲). در مقایسه با تیمارشاهد که سطح کورتیزول آن برابر با $408/33$ نانوگرم بر میلی لیتر است، میزان کورتیزول به واسطه بیهوشی با ۲- فنوکسی اتانول بلافاصله بعد از ریکاوری افزایش یافته است (شکل ۷) که نشان دهنده افزایش میزان استرس در ماهی در اثر بیهوشی با این ماده می‌باشد. همچنین مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن مبین این است که هیچ کدام از تیمارها با هم اختلاف معنی‌داری ندارند و همگی در یک گروه طبقه‌بندی می‌شوند.

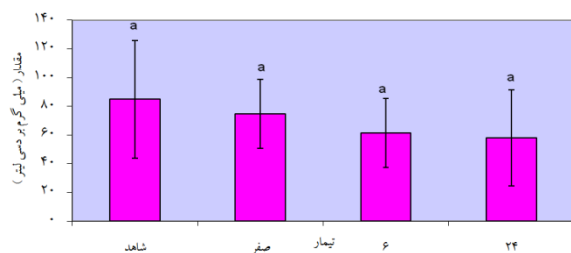


شکل ۲: میزان کورتیزول پلاسمای خون ماهی کپور نقره‌ای در تیمارهای مختلف ۲- فنوکسی اتانول.

نتایج تغییرات شاخص‌های استرس (گلوکز و کورتیزول) در ماهی کپور نقره‌ای بیهوش شده با عصاره گل میخک

الف) تغییرات میزان گلوکز

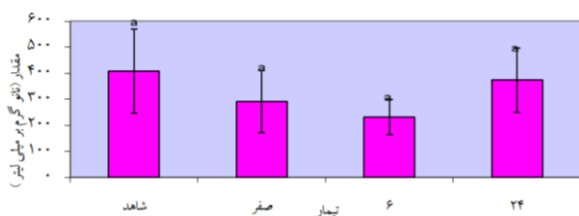
موسط مقدار گلوکز تیمارشاهد $41/04 \pm 84/83$ میلی گرم بر دسی لیتر و در هنگام نمونه‌گیری در زمان صفر، ۶ و ۲۴ ساعت بعد از ریکاوری به ترتیب $47/5 \pm 18/46$ ، $27/20 \pm 41/5$ ، $33 \pm 6/53$ میلی گرم بر دسی لیتر می‌باشد (شکل ۳). میزان گلوکز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$). با توجه به شکل ۳ بیش‌ترین میزان گلوکز خون در بیهوشی با عصاره گل میخک در زمان نمونه‌گیری در زمان ۶ می‌باشد. این مقدار بعد از گذشت ۲۴ ساعت روند کاهشی یافته و به کم‌ترین میزان خود رسید.



شکل ۵: میزان گلوکز پلاسمای خون ماهی کپورنقره‌ای در تیمارهای مختلف PI222

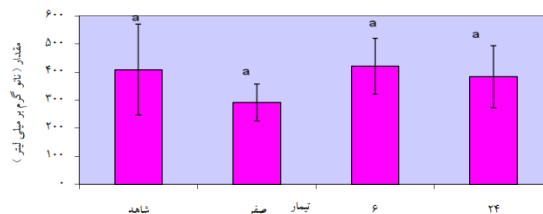
ب) تغییرات کورتیزول خون

در بیهوشی با PI222 میزان کورتیزول خون در زمان‌های ۰ و ۶ و ۲۴ ساعت بعد از ریکآوری به ترتیب $120/11 \pm 290/83$ ، $67/94 \pm 231/66$ ، $122/78 \pm$ $373/33$ نانوگرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد که اختلاف معنی دار نداشت ($P < 0/05$). بیشترین میزان کورتیزول در زمان ۲۴ و کمترین مقدار آن مربوط به زمان ۶ است (شکل ۶). همچنین با توجه به شکل ۶ در مقایسه با تیمار شاهد که سطح کورتیزول آن برابر با $408/33 \pm 161/82$ نانوگرم بر میلی لیتر است، میزان کورتیزول به واسطه بیهوشی با PI222 افزایشی پیدا نکرده است و طبق آزمون دانکن تیمار ۶ و شاهد در گروه‌های جداگانه قرار می‌گیرند و تیمارهای ۰ و ۲۴ به همراه هم در هر دو گروه جای می‌گیرند.



شکل ۶: میزان کورتیزول پلاسمای خون ماهی کپورنقره‌ای در تیمارهای مختلف PI222

با هم اختلاف معنی دار نداشته در نتیجه همگی در یک گروه طبقه‌بندی می‌شوند.



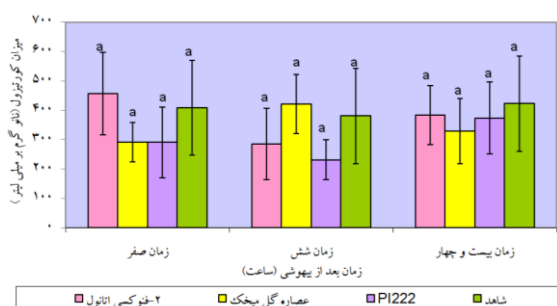
شکل ۴: میزان کورتیزول پلاسمای خون ماهی کپورنقره‌ای در تیمارهای مختلف عصاره گل میخک

نتایج تغییرات شاخص‌های استرس (گلوکز و کورتیزول) در ماهی کپورنقره‌ای بیهوش شده با PI222

الف) تغییرات میزان گلوکز

میزان گلوکز خون در بیهوشی با PI222، با توجه به شکل ۵ در زمان صفر یعنی بلافاصله بعد از ریکآوری در بیشترین میزان خود به مقدار $23/92 \pm 74/83$ میلی گرم بر دسی لیتر اندازه گیری شد. در زمان ۶ مقدار گلوکز $61/5 \pm 23/96$ میلی گرم بر دسی لیتر و کمترین مقدار آن در زمان ۲۴ به میزان $33/42 \pm 57/83$ میلی گرم بر دسی لیتر تعیین شد. آنالیز واریانس این داده‌ها نشان می‌دهد که میزان گلوکز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری را نشان نمی‌دهد ($P < 0/05$). این نتیجه حاصل می‌شود که با گذشت زمان میزان گلوکز کاهش یافته است. اما در تمام زمان‌ها سطح آن کمتر از سطح تیمار شاهد با مقدار $41/04 \pm 84/83$ میلی گرم بر دسی لیتر می‌باشد. طبق آزمون دانکن هیچ‌یک از تیمارها با هم اختلاف معنی دار نداشته در نتیجه همگی در یک گروه طبقه‌بندی می‌شوند.

می‌باشد که البته این افزایش معنی‌دار نیست و در مورد دو ماده بیهوشی دیگر این میزان کم‌تر از سطح شاهد قرار دارد. در زمان ۶ این روند برعکس شده و میزان کورتیزول فقط در عصاره گل‌میخک بالاتر از شاهد است که در این مورد نیز این افزایش معنی‌دار نیست و در دو ماده دیگر کم‌تر از شاهد می‌باشد. اما در زمان ۲۴ همگی مواد بیهوشی روند کاهشی را نسبت به شاهد نشان می‌دهد.



شکل ۸: مقایسه مقادیر کورتیزول خون ماهی کپور نقره‌ای در زمان‌های مختلف بعد از بیهوشی با ۲-فنوکسی اتانول، عصاره گل‌میخک، PI222 و تیمار شاهد.

بحث

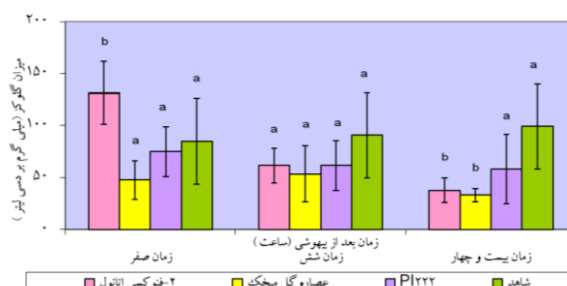
تغییرات گلوکز و کورتیزول

در جریان استرس در ماهی سطح گلوکز در اثر بالا رفتن سطوح کته‌کولامین‌ها افزایش می‌یابد که منجر به پدیده هایپرگلیسمی (افزایش میزان قندخون) می‌شود که از مهم‌ترین پاسخ‌های ثانویه در ارتباط با بالا رفتن کورتیزول است. هایپرگلیسمی توسط فعالیت هورمون‌های آدرنالین و کورتیزول و سایر کته‌کولامین‌های مترشحه در طی واکنش هشدار، ایجاد می‌شود (Wendelaar, 1993).

کورتیزول نیز مهم‌ترین گلوکوکورتیکوئید بدن است که از کلسترول سنتز می‌شود. کورتیزول از جمله مهم‌ترین فاکتورها در ارزیابی بروز پاسخ ماهیان نسبت به استرس محسوب می‌شود و افزایش این هورمون در

مقایسه مقادیر گلوکز خون در زمان‌های ۰، ۶ و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی با ۲-فنوکسی اتانول، عصاره گل‌میخک، PI222 و تیمار شاهد

مقایسه میزان گلوکز در تیمار شاهد و تیمارهای حاصله از دوز مناسب هر کدام از مواد بیهوشی، با توجه به شکل ۷ نشان می‌دهد که فقط ۲-فنوکسی اتانول در زمان صفر باعث افزایش میزان گلوکز در ماهی شد. زیرا مقدار آن بیش‌تر از میزان گلوکز تیمار شاهد در زمان صفر می‌باشد. ولی با گذشت ۶ و ۲۴ ساعت روند کاهشی داشته است و به سطحی کم‌تر از میزان شاهد رسیده است. عصاره گل‌میخک و PI222 دارای میزان گلوکز کم‌تری در تمام زمان‌ها نسبت به شاهد می‌باشند. به‌طور کلی، در ۲-فنوکسی اتانول افزایش اولیه در زمان صفر نشان دهنده افزایش استرس در ماهی در مواجهه با داروی بیهوشی است که با گذشت زمان این استرس کاهش یافته است.



شکل ۷: مقایسه مقادیر گلوکز خون ماهی کپور نقره‌ای در زمان‌های مختلف بعد از بیهوشی با ۲-فنوکسی اتانول، عصاره گل‌میخک، PI222 و تیمار شاهد.

مقایسه مقادیر کورتیزول خون در زمان‌های ۰، ۶ و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی با ۲-فنوکسی اتانول، عصاره گل‌میخک، PI222 و تیمار شاهد

با توجه به شکل ۸ در زمان صفر میزان کورتیزول فقط در مورد ۲-فنوکسی اتانول بیش‌تر از میزان شاهد

زمان بروز استرس در تمام ماهیان استخوانی به اثبات رسیده است (Pottinger and Donaldson, 1981؛ Carrick, 2001).

بالارفتن سطوح کورتیزول از علائم پاسخ اولیه به استرس می باشد و بالا رفتن غلظت گلوکز خون، از کار افتادن هورمون تیروئید، تغییرات الکترولیت ها و تغییرات رفتاری از پاسخ های ثانویه و ثالث استرس هستند که در صورت ادامه حضور عامل استرس بروز خواهند کرد (Schreck et al., 1991؛ MC Donald and Milligan, 1997). از مهم ترین کاربردهای مواد بیهوشی، کاهش و به حداقل رساندن استرس در خلال عملیات های مختلف می باشد. در واقع بیهوش کننده ها، فعالیت محور HPI مرتبط با عوامل استرس را کاهش داده و یا متوقف می کنند (Iwama et al., 1986). با این حال، عملیات بیهوشی می تواند خود واکنش های استرس زا را ایجاد کند (Thomas and Robertson, 1991).

در تحقیق حاضر، بیهوشی توسط ۲- فنوکسی- اتانول، باعث افزایش سطح گلوکز در ماهی کپورنقره- ای گردید. این افزایش نشان دهنده یک واکنش ثانویه آندوکرینی نسبت به استرس می باشد که در واقع این ماده بیهوشی نتوانسته از این واکنش جلوگیری کند. در نتیجه بیهوشی با ۲- فنوکسی اتانول باعث افزایش گلوکز در پلاسما و بروز استرس در ماهی شد. میزان کورتیزول نیز در زمان صفر بالاتر از سطح شاهد اندازه گیری شد که البته سطح آن نسبت به شاهد اختلاف معنی داری را نشان نداد.

در تحقیقی که توسط باورصادالله داد (۱۳۸۶)، بر روی بیهوشی با MS222 و گل میخک در فیل ماهی جوان انجام شد، استفاده از MS222 به عنوان یک ماده

بیهوشی در خلال عملیات دستکاری و جابجایی و خونگیری، توانست فعالیت محور HPI را کاهش یا متوقف کند در نتیجه این دارو باعث افزایش غلظت کورتیزول و گلوکز گردید و به عنوان ماده ای استرس زا معرفی گردید.

در مطالعه ای نیز که روی ماهی شانک سیاه (*Acanthopagrus schlegeli*) انجام شد مشخص گردید که میزان گلوکز خون تحت تأثیر ماده بیهوشی ۲- فنوکسی اتانول افزایش می یابد که با نتایج بررسی حاضر مطابقت می کند (Hseu et al., 1996). بنابراین به نظر می رسد که در تحقیق حاضر نیز، ۲- فنوکسی- اتانول، همانند MS222 و سایر داروهایی که باعث افزایش گلوکز و کورتیزول و در نتیجه تشدید استرس در ماهی می شوند، قادر به بلوک کردن سلول های اینترنال نمی باشد که نتیجه آن ترشح هورمون ACTH از هیپوفیز است که می تواند سلول های اینترنال را به منظور سنتز و ترشح کورتیکوستروئیدها تحریک کرده که حاصل آن افزایش گلوکز و کورتیزول خون ماهی است.

از سوی دیگر استفاده از برخی از مواد بیهوش کننده سبب ایجاد واکنش استرس و افزایش کورتیزول و گلوکز خون ماهیان نمی شود. در تحقیق حاضر، با توجه به شکل ۴ در بیهوشی با عصاره گل میخک سطح کورتیزول در ساعت ۶ نسبت به شاهد بالاتر بود اما اختلاف معنی داری را نشان نداد و نهایتاً نیز در ۲۴ ساعت بعد، میزان آن کاهش یافت. میزان گلوکز نیز با توجه به شکل ۳ در همه زمان ها کم تر از سطح شاهد بود که دلیلی بر غیر استرس زا بودن این ماده است. در تحقیقی که توسط باورصادالله داد (۱۳۸۶)، انجام شد در بیهوشی فیل ماهیان جوان با گل میخک، ماهیان بیهوش

شده دارای افزایش معنی دار کورتیزول و گلوکز سرم خون نمی باشند که این یافته مشابه تحقیقات صورت گرفته از جمله در گربه ماهی کانالی (Small, 2003) در ماهی آزاد آتلانتیک (*Salmo salar*) (Iverzen et al., 2003) و در گربه ماهی اروپایی (Velisek et al., 2006) می باشد که با بررسی حاضر مطابقت دارد.

در مورد بیهوشی با ماده بیهوش کننده PI222 و یا تأثیر این ماده بر میزان استرس در ماهی تاکنون تحقیقی صورت نگرفته است. در تحقیق حاضر نیز در ماهیان بیهوش شده با PI222، هردوی مقادیر گلوکز و کورتیزول کم تر از سطح شاهد بود (شکل های ۵ و ۶). در نتیجه این ماده هیچ گونه اثر استرس زایی برای ماهی کپورنقره ای به همراه نداشته است.

با توجه به نتایج حاصله ۲- فنوکسی اتانول از این نظر که باعث افزایش میزان گلوکز در ماهی کپورنقره ای شد می تواند به عنوان یک ماده بیهوشی استرس زا مورد توجه باشد. عصاره گل میخک و PI222 نیز به خاطر عدم افزایش میزان گلوکز و کورتیزول در ماهی کپورنقره ای به عنوان داروهای بیهوشی مناسب مطرح می شوند که البته باید توجه کرد که PI222 به مراتب تأثیر کمتری بر افزایش گلوکز و کورتیزول و در نتیجه استرس حاصله از بیهوشی بر ماهی کپورنقره ای داشته است. چون عصاره گل میخک باعث افزایش در مقدار کورتیزول در زمان ۶ نسبت به شاهد شد که البته تفاوت سطح اندک و غیر معنی دار بود. لذا از این حیث نسبت به PI222 که هیچ گونه افزایش سطحی در میزان گلوکز و کورتیزول در ماهی کپورنقره ای ایجاد نکرده است از درجه اطمینان کمتری از جهت ایجاد استرس برخوردار خواهد بود. علاوه بر این PI222 و عصاره گل میخک با توجه به عواملی مثل ارزان بودن و بی خطر

بودن برای ماهی و کاربر و عدم اثرات منفی فیزیولوژی بر ماهی و همچنین نداشتن عوارض زیست محیطی نسبت به ۲- فنوکسی اتانول نیز دارای برتری می باشند. با توجه به اینکه ۲- فنوکسی اتانول طبق گزارش Morton (۱۹۹۰) در استفاده های منظم باعث بعضی اختلالات عصبی- فیزیولوژیک در کاربر می شود. در صورتی که PI222 و عصاره گل میخک هر دو برای کاربر و ماهی کاملاً بی خطر می باشند و عصاره گل میخک حتی در مصارف انسانی به عنوان ادویه نیز مصرف می شود لذا بی خطر می باشند. همچنین این دو ماده می توانند در مطالعات میدانی کاربردی تر باشند زیرا دارای دوره منع مصرف نمی باشند. که این مزایا در PI222 بخصوص از حیث ارزان تر بودن بیش تر قابل توجه می باشد. به همین دلیل در هر مطالعه با گل میخک و یا PI222، بدون استثنا این مواد به عنوان جایگزینی مؤثر و قابل قبول برای سایر بیهوش کننده ها تلقی می شوند.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم مرکز تکثیر و پرورش آبزیان شوش که صمیمانه شرایط و امکانات انجام این بررسی را مهیا کردند تشکر و قدردانی می نمایم.

منابع

۱. باورصادالله داد، م.، ۱۳۸۶. بررسی اثرات استرس ناشی از دستکاری، تراکم ماهی و مواد بیهوشی و برخی شاخص های هورمونی و بیوشیمیایی و خونی در فیل ماهی جوان پرورشی (*Huso huso*). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات خوزستان، ۲۲۴ صفحه.
۲. تجار، س.، خدادادی، م.، جواهری، م.، ۱۳۹۰. مقایسه دوز مناسب سه ماده بیهوشی ۲- فنوکسی اتانول، عصاره گل میخک PI222 در ماهی کپورنقره ای

- sehlegeli). Journal of Taiwan Fisheries Research, 4(2), 127-132.
14. Iwama, G.K., Mcgeer, J.C., Pawluk, MP., 1989. The effects of five fish anesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. Canadian Journal of Zoology, 67(8), 2065-2073.
 15. Iverzen, M., Finstad, B., Mckinley, R.S., Eliassen, R.A., 2003. The efficacy of metomidate, Clove oil, Aqui-s and Benzoak as anesthetics in Atlantic Salmon stress-reducing capacity. Aquaculture, 22, 549-566.
 16. Mattson, N.S., Rippe, T.H., 1989. Metomidate, a better anesthetic for cod (*Gadus Morhua*) in comparison with Benzocaine, MS-222, Chlorobutanol, and Phenoxyethanol. Aquaculture, 83(1-2), 89-94.
 17. McDonal, D.G., Miligan, C.L., 1997. Chemical properties of the blood. In: Fish physiology, vol. XIIB, Eds; Hoar *et al.*, Academic press, 56-133.
 18. Merck and Company, 1989. The Merck Index, 11 th ed. 1606pp. Rahway, New Jersey: Merck and Company.
 19. Morton, W.E., 1990. Occupational Phenoxyethanol Aurotoxicity: a report of three cases. J. Occup. Med., 32, 42-45.
 20. Constantinos C. Mylonas, C. C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., Polzonetti-Magni, A., 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. Aquaculture, 246(1-4), 467-481.
 21. Pottinger, T.G., Carrick, T.R., 2001. ACTH dose not mediate divergent stress responsiveness in rainbow trout. Comparative Biochemistry & Physiology, 129A, 399-404.
 22. Schreck, C.B., Fitzpatrick M.S., G.W. Yeon, C.G., 1991. Steroids: development continuum between mother and offspring, In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolf, M.S. (EDS), Proceeding of the 4 th International symposium on the reproductive physiology of fish symp. 91, Sheffield, 256-258.
 23. Sink, T.D., Lochmann, R.T., Fecteau, K.A., 2008. Validation use and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish largemouth bass red pacu and golden shiners. Fish Physiol. Biochem, 34, 95-101.
 24. Small, B.C., 2003. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldin and clove oil anesthetized channel
- (*Hypophthalmichthys molitrix*) مجله پژوهش‌های علوم و فنون دریایی تهران شمال، ۶(۳)، ۴۰ - ۵۲.
۳. رأس، ل.ج.، رأس، ب.، ۱۹۹۹. فنون بیهوشی و تسکین در آبزیان، (ترجمه) سعید میرزگر، مسعود صیدگر. ۱۳۸۴. انتشارات دانشگاه تهران، ۲۲۷ صفحه.
 ۴. رحمانی فرح، ک.، مولودی، ز.، معینی، س.، شعبانپور، ب.، شعبانی، ع.، ایمانپور، م.، ۱۳۸۹. مقایسه تأثیر بیهوشی با CO₂، عصاره گل میخک و کشتار خارج از آب برگوشت ماهی کپور معمولی. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۵(۴).
 ۵. سلطانی، م.، امید بیگی، ر.، رضوانی، س.، مهربانی، م.، چیت ساز، ح.، ۱۳۸۰. مطالعه اثرات هوشبری اسانس و عصاره گل میخک در قزل آلائی رنگین کمان را تحت برخی شرایط کیفی آب. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۶(۴)، ۸۵-۸۹.
 ۶. سلطانی، م.، غفاری، م.، خضرائی‌نیا، پ.، بکایی، س.، ۱۳۸۳. اثرات بیهوشی اسانس گل میخک هندی بر پارامترهای هماتولوژیک، برخی آنزیم‌های خون و آسیب‌شناسی بافت‌های مختلف ماهی کپور معمولی، مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۹(۳).
 ۷. کیوانی، ی.، ۱۳۸۷. خلاصه رده‌بندی فیلوژنتیکی ماهی‌ها. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان، ۲۲۰ صفحه.
 ۸. مهربانی، ی.، ۱۳۷۶. مطالعه اثر بیهوشی پودر گل میخک بر روی ماهی قزل آلائی رنگین کمان. آبزی‌پرور، ۲۱، ۴۶-۴۹.
 ۹. وثوقی، غ.، مستحجیر، ب.، ۱۳۸۵. ماهیان آب شیرین. انتشارات دانشگاه تهران، ۴۱۷ صفحه.
 10. Abdolazizi, Sh., Ghaderi, E., Naghdi N., Bahrami Kamang, B., 2011. Effects of Clove oil as an anesthetic on Some Hematological Parameters of *Carassius auratus*. Aquaculture Research & Development, 2(1).
 11. Adetunji, O.R., Adeleye, J.O., Salako, B.L., Kutu, M.A., 2008. Usefulness of single spot plasma glucose at routine clinic a preliminary report. Pract. Diabetes Internatio., 25, 66-68.
 12. Donaldson, E.M., 1981. The pituitary-Interrenal axis as an Indicator of stress in fish. In: Pickering, A.D. (Ed.), Stress and Fish. Academic press, London, 11-40.
 13. Hseu Jinn, R., Yeh Shinn, L., Chu Yeong, T., Ting Yun, Y., 1996. Influence of the anesthetic, 2-phenoxy ethanol, on Hematological parameters of black porgy (*Acanthopagrus*

- drum (*Selaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate, Aquaculture, 96(1), 69-80.
28. Velisek, J., Walson, T., Gomulka, P., Svobodova, Z., Novotny, L., Ziomek, E., 2006. Effects of clove oil anesthesia on European Catfish (*Silurus glanis* L.) Acta Vet, BR NO, 75, 99-106.
 29. Wendelaar, B.S.E., 1993. Endocrinology. In: Evans, D.H. (Ed.), The physiology of fishes. CRC Press, FL. 469-305.
 - catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture, 218, 177-185.
 25. Sattari, A., Mirzargar, S.S., Abrishamifar, A., Pourakzadegan, R., Bahonar, A., Mousavi, H.E., Niasari, A., 2009. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 4(6), 306-313.
 26. Schoettgar, R.A., Julin, A.M., 1967. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids, Invest. Fish Control U.S, Dept. Int. 13, 1-15.
 27. Thomas, P., Robertson, L., 1991. Plasma cortisol and glucose stress responses of reef