مجله علمی شیلات ایران ۳۲(۲) ٤٧-٦٢ (DOI): 10.22092/ISFJ.2023.129251

مقاله علمی – پژوهشی:

اثر ۲–فنوکسی اتانول بر ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

علی خسروانی‌زاده*[۱]، عبدالعلی راهداری[۱]، ساحل پاکزاد توچایی[۲]

*Khosravani.ali@uoz.ac.ir

۱- گروه علوم آبزیان، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران
۲- گروه اکوسیستم‌های طبیعی، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱٤۰۱ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱٤۰۲

چکیده

پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر داروی بیهوشی ۲–فنوکسی اتانول بر ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) در بافت‌های مختلف (مغز، آبشش، کبد، خون و موکوس) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مراحل مختلف بیهوشی بلافاصله و ۲۴ ساعت پس از بیهوشی صورت گرفت. ابتدا تعداد ۱۸۰ عدد ماهی با میانگین وزن ۰/۸±۵/۸۲ گرم در ۶ گروه (هر گروه با ۳ تکرار) تقسیم و در معرض غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵ و ۰/۶ میلی‌لیتر در لیتر ۲–فنوکسی اتانول برای تعیین حداقل غلظت بیهوش‌کنندگی قرار گرفتند. حداقل غلظت ۲–فنوکسی اتانول برای ایجاد بیهوشی، ۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر تعیین شد. سپس برای ارزیابی اثر این غلظت از ماده بیهوشی بر ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، تعداد ۷۲ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۰/۷۳±۵/۷۹ گرم در دو گروه شاهد و آزمایش (هر گروه ۳۶ قطعه ماهی) جایابی شدند. از ماهیان هر دو گروه در زمان‌های صفر (بلافاصله بعد از بیهوشی) و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی، نمونه‌های سرم خون، موکوس پوست و عصاره‌های بافتی (مغز، آبشش و کبد) تهیه و آنزیم‌های SOD، CAT، GPx و نیز پروتئین در آنها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که داروی بیهوشی ۲–فنوکسی اتانول سبب مهار ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی بافت‌های مختلف، احتمالاً از طریق افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب اکسیداتیو شد. مقایسه نتایج ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های مختلف ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بیهوش‌شده با ۲–فنوکسی اتانول و تفاوت آشکار در سیر نزولی یا صعودی این آنزیم‌ها نشان می‌دهد که روش غیرتهاجمی (نمونه‌های موکوس و خون) برای بیان وضعیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با داروی بیهوشی ۲–فنوکسی اتانول مناسب نیست.

لغات کلیدی: سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، استرس اکسیداتیو، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

*نویسنده مسئول

مقدمه

به‌کارگیری عوامل مهارکننده استرس یک تکنیک متداول در آبزی‌پروری مدرن محسوب می‌شود. این دسته از مواد برای القاء بیهوشی در طول دست‌کاری، رقم‌بندی، نشانه‌گذاری، فرآیند تکثیر مصنوعی و جراحی مورداستفاده قرار می‌گیرند. لذا، موجب تقلیل مشکلات ناشی از اثر استرس (کاهش مصرف غذا و ضعف عملکرد سیستم ایمنی) می‌شوند (Ross and Ross, 1999). تغییرات وابسته به استرس در شیمی خون در مدت کوتاهی (چند ثانیه) در زمانی که ماهی تحت استرس قرار دارد، رخ می‌دهد (Barton and Iwama, 1991). تغییرات مذکور شامل: تغییر در سطح هورمون‌های موجود در پلاسما، تغییر متابولیسم انرژی و تغییر در تعادل الکترولیت‌ها هستند. پرورش‌دهندگان و زیست‌شناسان ماهی از شاخص‌های شیمی خون به منظور ارزیابی پاسخ‌های ماهی به استرس، وضعیت تغذیه، کیفیت مولد، آسیب بافتی در عملیات دست‌کاری و شرایط سلامت ماهی بهره می‌برند (Wagner and Congleton, 2004). در ماهی همانند سایر جانداران هوازی، یک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، اثرات سمی سیستم القاء استرس اکسیداتیو را متعادل می‌کند. استرس اکسیداتیو سلولی زمانی اتفاق می‌افتد که سیستم القاء استرس اکسیداتیو با شدت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی را تحت‌فشار قرار می‌دهد. این دفاع آنتی‌اکسیدانی دربردارنده سازوکارهای آنزیمی و غیرآنزیمی است. این سیستم می‌تواند از شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که می‌توانند با ماکرومولکول‌های زیستی مستعد واکنش دهند و هیدرو پراکسیداسیون چربی، تخریب DNA و کربنیل‌های پروتئین را تولید کنند و منجر به استرس اکسیداتیو شوند، جلوگیری کند (Cazenave *et al*., 2006; Zhang *et al*., 2008).

۲- فنوکسی اتانول[1] (اتیلن گلایکول مونو فنیل اتر[2] $C_8H_{10}O_2$) یک ماده مایع، بی‌رنگ، روغنی و معطر است (Schmuck *et al*., 2000). نخستین استفاده از ۲-فنوکسی اتانول برای بیهوش کردن آزادماهیان در سال ۱۹۶۳ در کانادا گزارش شد (Bell, 1964) و خیلی زود به همراه تری کائین متان سولفونات (MS222)[3] (Tubio *et el*., 2010) و اسانس گل میخک (Khosravanizadeh *et al*., 2012) از داروهای بیهوشی مهم در صنعت آبزی‌پروری گردید. از این ماده در حال حاضر برای بی‌حرکت کردن کوتاه‌مدت ماهی برای تکثیر مصنوعی و برای لمس نمودن ماهیان بیرون از آب استفاده می‌شود (Berlinsky *et al*., 2016). ۲-فنوکسی اتانول، به رغم اثرات منفی ثانویه و اثرات بالقوه بر سیستم اعصاب مرکزی، به دلیل تهیه و آماده‌سازی آسان، قیمت پایین، عملکرد سریع، ریکاوری سریع و بدون عارضه و خصوصیات ضد باکتریایی و ضد قارچی، به عنوان یک بیهوش‌کننده مناسب برای آبزی‌پروری در نظر گرفته می‌شود (Priborsky and Velisek, 2018). اما نباید از نظر دور داشت که ۲-فنوکسی اتانول می‌تواند به شکل معنی‌داری شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون (Svacina *et al*., 2016)، پروفایل خون‌شناسی (Akbary *et al*., 2016)، نشانگرهای زیستی استرس اکسیداتیو (Velisek *et al*., 2011) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (Priborsky *et al*., 2015) ماهیان را تغییر دهد. ۲-فنوکسی اتانول نمی‌تواند پاسخ ماهی به استرس را مسدود نماید، در دوزهای پایین سبب تغییر در غلظت کورتیزول (Filiciotto *et al*., 2012)، گلوکز (Velisek *et al*., 2009) یا لاکتات (Molinero and Gonzalez, 1995) بعد از بیهوشی گردیده است. پیش‌ازاین در معدود مطالعاتی، اثر بیهوشی با ۲-فنوکسی اتانول بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال، ۲-فنوکسی اتانول در غلظت ۰/۴ میلی‌لیتر در لیتر با افزایش شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن، آسیب اکسیداتیو به چربی‌ها و پروتئین‌ها و مهار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در قزل‌آلای رنگین‌کمان همراه بوده است (Velisek *et al*., 2011). Priborsky و همکاران (۲۰۱۵) با قطع فرآیند اکسیداسیون طبیعی در barbel پس از بیهوشی با ۲-فنوکسی اتانول (۰/۴ میلی‌لیتر در لیتر) به نقصان سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) اشاره کرده‌اند.

[1] 2-Phenoxyethanol
[2] Ethylene glycol monophenyl ether
[3] Tricaine Methanesulfonate (MS222)

در شرایط نرمال فیزیولوژیک، حدود ۲ درصد از اکسیژن مصرفی به‌وسیله میتوکندری در زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی به شکل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) آزاد می‌شود که می‌تواند به آسیب DNA، غیرفعال‌شدن آنزیم‌ها، آسیب اکسیداتیو به پروتئین‌های ساختاری و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء منجر شود (Halliwell and Gutteridge 2007; Jafarinejad *et al*., 2020). همچنین وقتی ماهیان در معرض عفونت‌های میکروبی، آلودگی‌ها، سم‌ها و آفت‌کش‌ها قرار گیرند، گونه‌های فعال اکسیژن شکل می‌گیرند (Faggio *et al*., 2018; Sehonova *et al*., 2019). استرس اکسیداتیو به‌واسطه شکل‌گیری ROSs مانند هیدروژن پروکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و رادیکال‌های آنیون سوپر اکسید که عمدتاً محصولات فرعی متابولیسم اکسیداتیو هستند، ایجاد می‌شود (Zhang *et al*., 2003). استرس اکسیداتیو می‌تواند به عنوان یک اختلال در وضعیت هم‌ایستایی (هموستازی) بین ROSs و مکانیزم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی تعریف شود (Birben *et al*., 2012). اثرات بیولوژیک ROSs در ماهیان به‌وسیله طیف گسترده‌ای از آنتی‌اکسیدان‌ها مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (GPx، SOD، GST و CAT)، آنتی‌اکسیدان‌های با منشاء تغذیه‌ای (ویتامین‌های C، E و A، گلوتاتیون، اسیداوریک، GSH و لیپوئیک اسید)، مواد معدنی (روی، سلنیوم، مس، منگنز و آهن) و پروتئین‌های کلات‌کننده فلزی (فریتین، لاکتوفرین، آلبومین، سرولوپلاسمین) کنترل می‌شوند (Gharaei *et al*., 2020). با توجه به این‌که داروهای بیهوشی از طریق آبشش‌ها وارد بدن ماهیان شده و در ادامه در سرتاسر بدن توزیع می‌شوند و می‌توانند اثرات مضر احتمالی بالقوه خود را بر اندام‌های مختلف برجا گذارند، مطالعه تغییرات سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به عنوان یکی از مهم‌ترین سدهای دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان می‌تواند شاخص مفیدی برای ارزیابی ایمنی داروهای بیهوشی قلمداد شود. نظر به حضور این آنزیم‌ها در بافت‌های مختلف بدن، مطالعه در خصوص تعیین بهترین محل نمونه‌برداری که ضمن داشتن کمترین عوارض برای ماهی به نحو بهتری تغییرات را نشان دهد، می‌تواند زمینه لازم را برای تشخیص غلظت‌های مناسب داروهای بیهوشی ایمن برای هر گونه از ماهیان فراهم سازد. با مروری بر تحقیقات انجام شده در زمینه بیهوشی ماهیان، کمبود مطالعات در خصوص اثرات جانبی بیهوش‌کننده‌های مورداستفاده در آبزی‌پروری بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان مشهود است. از سوی دیگر، با توجه به اهمیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در صنعت آبزی‌پروری کشور (Salehi and Khosravanizadeh, 2010) و منطقه و رتبه نخست ایران در تولید این گونه در جهان (FAO FishStat, 2023)، ضرورت انجام این مطالعه دوچندان می‌گردد. در این تحقیق اثرات احتمالی بیهوشی با ۲-فنوکسی اتانول بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در بافت‌های مختلف ماهی بررسی و مقایسه می‌گردد تا به این سؤال پاسخ داده شود که آیا استفاده از شیوه‌های کمتر تهاجمی نظیر جمع‌آوری موکوس یا خون‌گیری، شاخص مناسبی برای نشان‌دادن اثر داروی بیهوش‌کننده ۲-فنوکسی اتانول بر وضعیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان هستند یا خیر؟

مواد و روش کار

تهیه ماهی و آماده‌سازی تانک‌ها

تعداد ۲۵۲ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با متوسط وزن ۵/۸۲±۰/۸ گرم از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان بومی زهک تهیه و به سالن تکثیر و پرورش آبزیان پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون پژوهشگاه زابل منتقل گردید. ماهیان جهت تطابق با محیط جدید به مدت ۱۰ روز در مخازن با حجم ۳۰۰ لیتری محتوی ۲۵۰ لیتر آب تازه (آب شهر کلرزدایی شده) که به‌وسیله سنگ هوا، هوادهی می‌شد، نگهداری شدند. ماهیان روزی دو بار با جیره تجاری SFT2 شرکت فرادانه تغذیه و ۵۰ درصد آب مخزن روزانه تعویض می‌شد. در تمام دوره تطابق‌دهی و انجام آزمایش‌ها، پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب (آب مورداستفاده آب شهری کلرزدایی شده بود) شامل دما، اسیدیته، میزان اکسیژن محلول و سختی آب سنجش و ثبت گردید. ۲-فنوکسی اتانول مورداستفاده از نمایندگی شرکت مرک آلمان خریداری گردید.

تیمارهای آزمایش

شیوه نمونه‌برداری در این مطالعه به صورت تصادفی و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. بعد از گذشت مدت سازگاری، به منظور تعیین حداقل دوز بیهوش‌کننده تعداد ۱۸۰ قطعه از ماهیان به شکل تصادفی به ۶ گروه ۱۰ تایی تقسیم و به آکواریوم‌های جداگانه انتقال یافتند. گروه‌های ۶ گانه با دوزهای صفر، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵ و ۰/۶ میلی‌لیتر در لیتر ۲- فنوکسی اتانول به روش حمام بیهوش شدند. بیهوشی در یک آکواریوم ۲۰ لیتری حاوی ۱۰ لیتر آب و ماده بیهوشی (۲- فنوکسی اتانول) در غلظت‌های مذکور به‌دست‌آمده بود، انجام شد. با معرفی هر ماهی به ظرف حاوی ماده بیهوشی با غلظت‌های تعریف شده، زمان رسیدن به مراحل ازدست‌دادن تعادل و بیهوشی سبک مطابق تعاریف ارائه شده در جدول ۱ بادقت صدم ثانیه به‌وسیله کرنومتر ثبت شد، تا پس از محاسبات آماری کمترین غلظت لازم برای بیهوشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌دست آید. سایر ماهیان (۷۲ قطعه) با میانگین وزنی ۰/۷۳±۵/۷۹ گرم به صورت تصادفی در ۲ گروه و با ۳ تکرار (در هر تکرار ۱۲ عدد ماهی) جایابی شدند. گروه یک تحت عنوان شاهد در نظر گرفته شد و ماهیان در این گروه بیهوش نشدند. ماهیان گروه دو با حداقل غلظت لازم از ۲- فنوکسی اتانول (۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر، به‌دست‌آمده از مرحله قبل)، بیهوش شدند. برای این منظور غلظت مذکور در آکواریومی با آب تمیز ایجاد و ماهیان به شیوه غوطه‌وری به صورت انفرادی در محلول بیهوشی جهت بیهوش شدن قرار گرفتند. دما، اسیدیته و اکسیژن آب آکواریوم بیهوشی اندازه‌گیری و ثبت شد. در طول انجام آزمایش هوادهی انجام شد. بعد از در معرض قراردادن هر یک از ماهیان با ماده بیهوشی زمان‌های رسیدن به مراحل ازدست‌دادن تعادل و بیهوشی سبک بادقت صدم ثانیه به‌وسیله کرنومتر ثبت شد (Keene *et al*., 1998).

با رسیدن ماهیان به مرحله بیهوشی سبک، ماهیان بیهوش شده برای بازگشت از بیهوشی به آکواریوم احیاء حاوی ۵۰ لیتر آب فاقد ماده بیهوشی که به‌خوبی هوادهی می‌گردید، منتقل شدند و زمان‌های مربوط به مراحل مختلف بازگشت از بیهوشی شامل مراحل بازگشت تعادل و بازگشت واکنش‌پذیری نسبت به محرک‌های خارجی (احیا کامل) به‌دقت ثبت گردید (جدول ۱) (Keene *et al*., 1998).

جدول ۱: دسته‌بندی مراحل بیهوشی در ماهیان (Keene *et al*., 1998)

Table 1: Classification of anesthesia stages in fish (Keene *et al*., 1998)

مرحله	رفتار ماهی
ازدست‌دادن تعادل	فقدان کامل تعادل، افزایش موقتی تعداد تنفس، واکنش‌پذیر نسبت به محرک‌های لمسی قوی
القا بیهوشی سبک	ازدست‌رفتن کامل تونیسیته عضلات، عدم پاسخ‌گویی به محرک‌های خارجی، ضربان قلب آهسته
بازگشت تعادل	بازگشت کامل تعادل، افزایش تعداد تنفس
احیا کامل	شنا عادی، واکنش‌پذیر نسبت به انواع محرک‌های خارجی

نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نیمی از ماهیان هر تکرار در گروه‌های آزمایش در ساعت صفر (بلافاصله بعد از بیهوشی) و نیمی دیگر در ساعت ۲۴ ساعت (۲۴ ساعت بعد از بیهوشی) نمونه‌برداری شدند. نمونه‌برداری از ماهیان شامل خون‌گیری، جمع‌آوری موکوس از پوست ماهیان و بافت‌های کبد، مغز و آبشش (برای هر بافت ۳ نمونه از هر تکرار) بود. برای خون‌گیری از ماهیان، از هر ماهی ۱ سی‌سی خون از محل ورید ساقه دمی، در انتهای باله مخرجی به‌وسیله سرنگ ۱ سی‌سی استریل گرفته شد و پس از جداکردن سرسوزن در تیوب اپندورف شماره‌گذاری شده فاقد هپارین تخلیه گردید. نمونه‌های خون پس از لخته‌شدن به مدت ۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور گردش در دقیقه سانتریفیوژ شده، سرم خون به‌دست‌آمده در ادامه تا زمان سنجش نمونه‌های سرم در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد حفظ شدند (Velisek *et al*., 2011; Gharaei *et al*., 2020).

بافت‌های آبشش، مغز و کبد ۳ ماهی از هر تکرار به‌دقت از بدن خارج و بادقت ۱ میلی‌گرم توزین شدند. به کمک

هموژنایزر یک محلول هموژن ۵ درصد از بافت‌های مذکور در سرم فیزیولوژی تهیه شد. محلول‌های حاصل با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و از بخش (فاز) فوقانی نمونه‌ها به منظور سنجش میزان آنزیم‌ها استفاده گردید (Velisek *et al*., 2011). جهت جمع‌آوری موکوس ماهیان از روش Ross و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد. برای این منظور ماهیان (۳ ماهی در هر تکرار) به صورت انفرادی به یک کیسه پلی‌اتیلنی حاوی ۱۰ سی‌سی محلول سرم فیزیولوژی منتقل و بعد از ۱ دقیقه تکان‌دادن ماهی خارج و محلول حاوی موکوس ذخیره و تا زمان انجام آزمایش‌ها به فریزر ۸۰- منتقل گردید (Ross *et al*., 2000).

اندازه‌گیری متغیرها

در نمونه‌های سرم، عصاره‌های بافت‌ها و موکوس به‌دست‌آمده از ماهیان گروه‌های مختلف، غلظت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) سنجش شدند.

سنجش آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با بهره‌گیری از کیت شرکت پادگین طب از محصولات شرکت زلبیوی آلمان (Zelbio, Germany) و به شیوه رنگ‌آمیزی و قرائت در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر صورت پذیرفت (Zelen *et al*., 2010). سنجش آنزیم کاتالاز به‌وسیله کیت شرکت پادگین طب محصول زلبیوی آلمان انجام شد. اندازه‌گیری به روش رنگ‌سنجی و با طول موج ۴۰۵ نانومتر صورت گرفت (Zelen *et al*., 2010; Barbaneagra *et al*., 2012). برای سنجش آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز از شیوه آنزیمی بهره گرفته شد. در این شیوه سرعت اکسیدشدن گلوتاتیون از طریق H_2O_2 که به کمک گلوتاتیون پراکسیداز حاد در همولیزیت کاتالیز می‌گردد، اندازه گرفته شد. اکسید حاصله از گلوتاتیون، بار دیگر و به کمک آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز احیاء شده و NADPH به NADP بدل گردید. با قرائت تغییرات در جذب NADPH در طول‌موج ۴۱۲ نانومتر می‌توان سرعت تولید گلوتاتیون را سنجش نمود (Anderson *et al*., 1997).

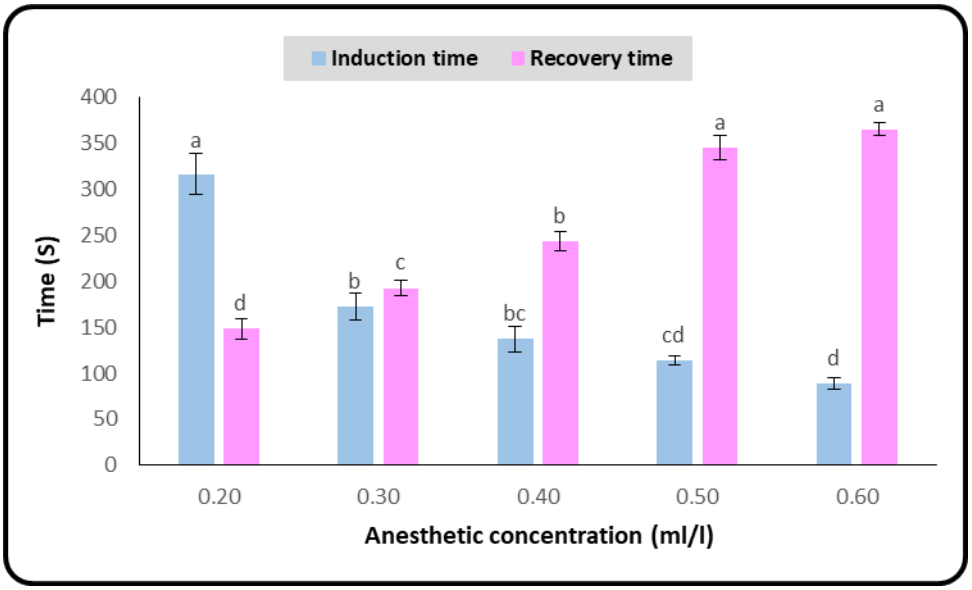
روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نرمال بودن داده‌ها استفاده از آزمون Shapiro–Wilk بررسی شد. پس از بررسی همگنی واریانس‌ها، جهت آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزارهایی Excel و SPSS (ویرایش ۲۲) استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌های مطالعه، با کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way-ANOVA) و نیز آزمون توکی (Tukey's) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج

اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب شامل: دما (به طور متوسط ۱/۱۱±۱۴/۱۰)، اسیدیته (به طور متوسط ۰/۲۷±۸/۳۰)، میزان اکسیژن محلول (به طور متوسط ۰/۵۶±۸/۱۴ میلی‌گرم در لیتر) و سختی آب (به طور متوسط ۱۵/۰۷±۲۱۱/۱۴ میلی‌گرم در لیتر بر حسب کربنات کلسیم) در طول مدت سازگاری و انجام آزمایش تغییرات بسیار ناچیزی را نشان داد و فاکتورهای مذکور در حد توصیه شده بودند. نتایج به‌دست‌آمده از معرض قرار دهی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با غلظت‌های مختلف ۲-فنوکسی‌اتانول و پارامترهای زمانی مختلف شامل مدت‌زمان ایجاد بیهوشی سبک و مدت‌زمان بازگشت واکنش‌پذیری نسبت به محرک‌های خارجی مانند ضربه‌زدن به شیشه آکواریوم (احیا کامل) به ترتیب در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده (شکل ۱)، کمترین غلظت ۲-فنوکسی اتانول برای ایجاد بیهوشی مطلوب در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر تعیین شد که به طور میانگین طی مدت زمان ۱۴/۵۲±۱۷۲/۰۰ ثانیه موجبات بیهوشی ماهیان را فراهم کرد، متوسط زمان لازم برای احیاء و بازگشت واکنش‌پذیری ماهیان نسبت به محرک‌های خارجی (احیا کامل) در این غلظت ۸/۵۰±۱۹۲/۳۳ ثانیه بود. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، غلظت ۲-فنوکسی اتانول با زمان موردنیاز برای القا بیهوشی رابطه عکس و با مدت‌زمان لازم جهت بازگشت ماهیان از بیهوشی رابطه مستقیم داشت به‌طوری‌که با افزایش غلظت ۲-فنوکسی اتانول در محلول بیهوشی از ۰/۲ به ۰/۶ میلی‌لیتر در لیتر، زمان لازم برای رسیدن به مرحله بیهوشی سبک در ماهیان کاهش یافت. مدت زمان موردنیاز برای القاء بیهوشی در ماهیان در غلظت

۰/۲ میلی‌لیتر در لیتر (کمترین غلظت مورداستفاده) به طور متوسط ۲۸/۵۸±۲۲۸/۰۰ ثانیه و به شکل معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بیشتر از مدت‌زمان موردنیاز برای القاء بیهوشی در ماهیان در غلظت ۰/۶ میلی‌لیتر در لیتر (بیشترین غلظت مورداستفاده) بود. در خصوص زمان موردنیاز برای بازگشت از بیهوشی نیز با افزایش غلظت داروی بیهوشی (۲-فنوکسی اتانول) مدت‌زمان لازم برای بازگشت ماهیان از بیهوشی بیشتر شد به‌طوری‌که تفاوت این پارامتر برای حداقل و حداکثر غلظت ۲-فنوکسی اتانول به‌کار برده شده در این تحقیق، به طور متوسط ۱۶/۴۴±۲۱۶/۶۶ ثانیه و از نظر آماری اختلافی معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بود (شکل ۱).



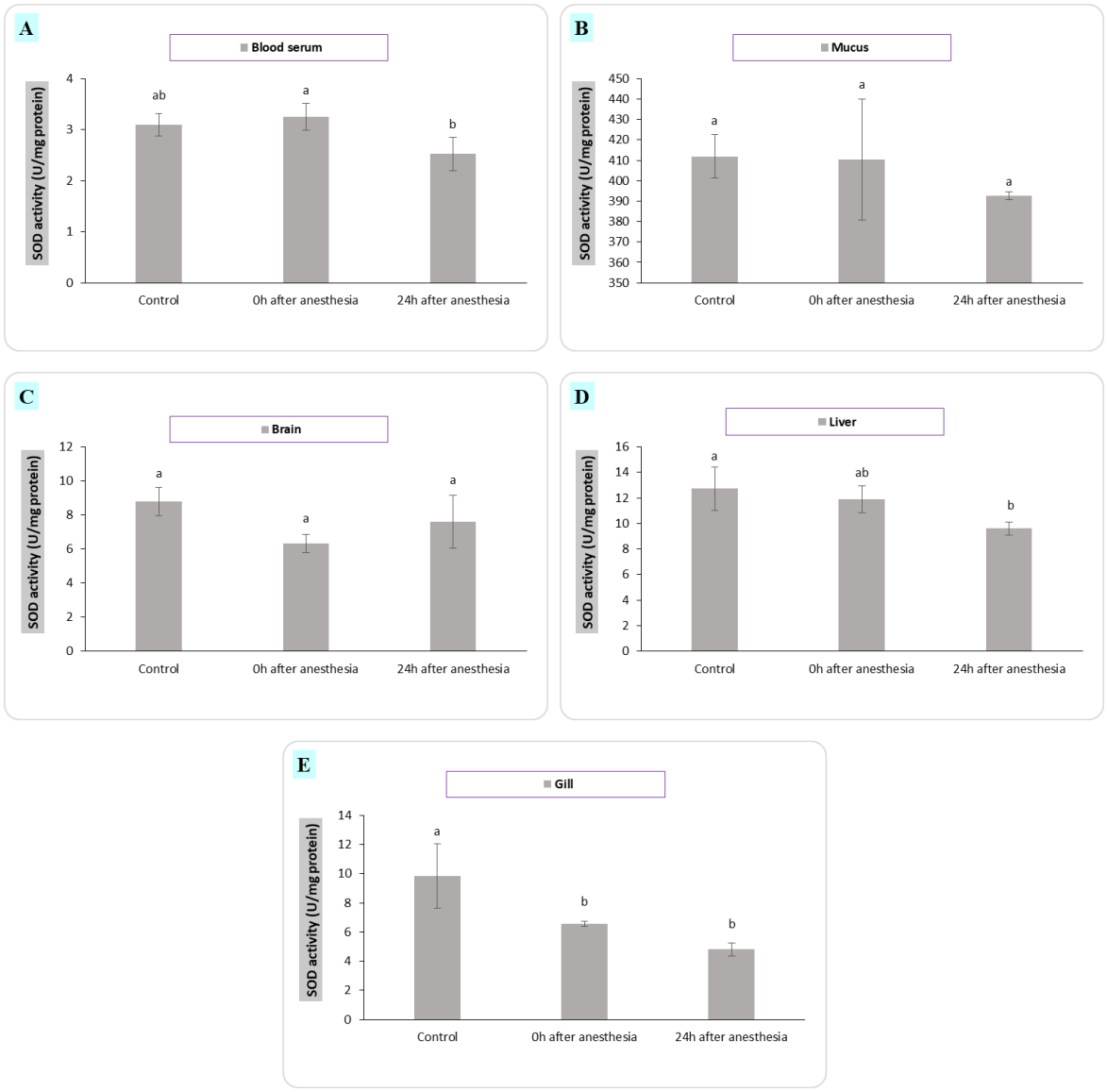
شکل ۱: اثرات بیهوش‌کنندگی غلظت‌های مختلف ۲-فنوکسی اتانول در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

Figure 1: Anesthetic effects of different concentrations of 2-phenoxyethanol in rainbow trout

مشاهده رفتار ماهیان بیهوش شده در مدت ۹۶ ساعت پس از بیهوشی، بیانگر بی‌خطر بودن ۲-فنوکسی اتانول در غلظت‌های به‌کار گرفته شده در این پژوهش برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است، زیرا هیچ‌گونه اثر منفی شامل تغییرات ظاهری مانند تغییر رنگ، تغییرات رفتاری مانند مشکل در شنا و مشکلات تنفسی در ماهیان قرار گرفته در معرض داروی بیهوشی مشاهده نشد. همچنین در طول مدت مذکور هیچ‌گونه تلفاتی در ماهیان رخ نداد.

مقایسه فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در بافت‌های مختلف بدن (خون، موکوس، مغز، کبد و آبشش) در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بیهوش شده با حداقل دوز بیهوش‌کننده ۲-فنوکسی اتانول (۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر) بلافاصله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی با ماهیان گروه شاهد که بیهوشی در آنها اعمال نشده بود، در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج نمایش داده در شکل ۲ که میزان فعالیت آنزیم SOD در بافت‌های مختلف را برحسب واحد بین‌المللی بر میلی‌گرم پروتئین (U/mg protein) مقایسه می‌کند، بیهوشی با ۲- فنوکسی اتانول سطح آنزیم SOD در ماهیان را بلافاصله بعد از بیهوشی و در فاصله ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی در بافت‌های کبد (شکل ۲-D) (در این بافت کاهش رخ‌داده بلافاصله بعد از بیهوشی معنی‌دار نبوده است)، مغز (شکل ۲-C) و آبشش (شکل ۲-E) در مقایسه با گروه شاهد به شکل معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش داده است. اما در سطح آنزیم SOD در بافت‌های خون (شکل ۲-A) و موکوس (شکل ۲-B) در مقایسه با ماهیان گروه شاهد تغییر معنی‌داری ($p>۰/۰۵$) بین سه گروه مشاهده نشد. مقایسه سطح آنزیم SOD در بافت‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان می‌دهد که در هر

سه تیمار (شاهد، بلافاصله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی) بالاترین میزان آنزیم SOD برحسب واحد بین‌الملل بر میلی‌گرم پروتئین (U/mg protein) در موکوس ۱۰/۶۴±۴۱۱/۸۵ ($p<0/05$) و پایین‌ترین سطح در سرم خون ۰/۲۲±۳/۰۹ مشاهده شد (شکل ۲).

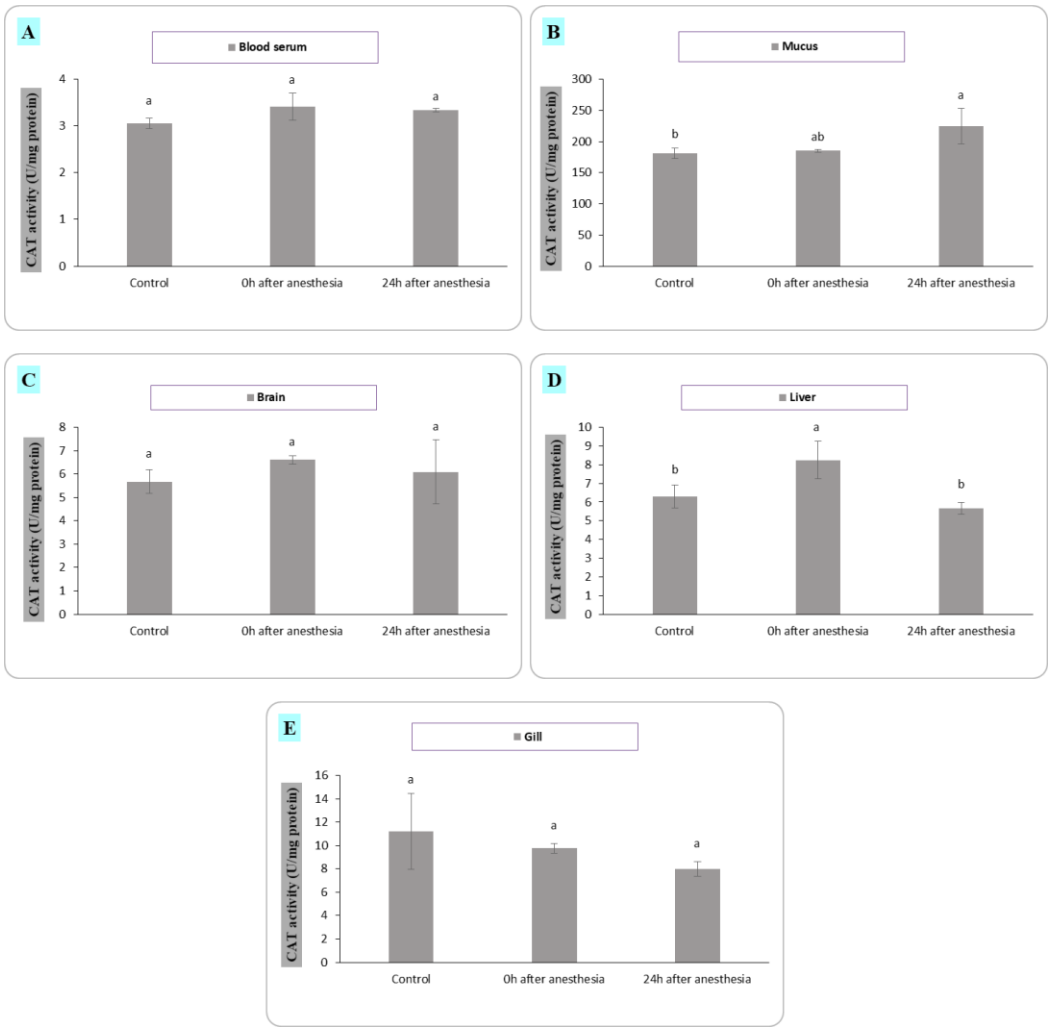


شکل ۲: تغییرات سطح آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در بافت‌های مختلف ماهیان بیهوشی شده با ۲-فنوکسی اتانول بلافاصله و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی

Figure 2: Superoxide dismutase (SOD) enzyme level changes in different tissues of anesthetized fish with 2-phenoxyethanol immediately and 24 hours after anesthesia

مقایسه فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در بافت‌های مختلف بدن (سرم خون، موکوس، مغز، کبد و آبشش) در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بیهوش شده با حداقل دوز بیهوش‌کننده ۲-فنوکسی اتانول (۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر) بلافاصله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی با ماهیان گروه شاهد که بیهوشی در آنها اعمال نشده، در شکل

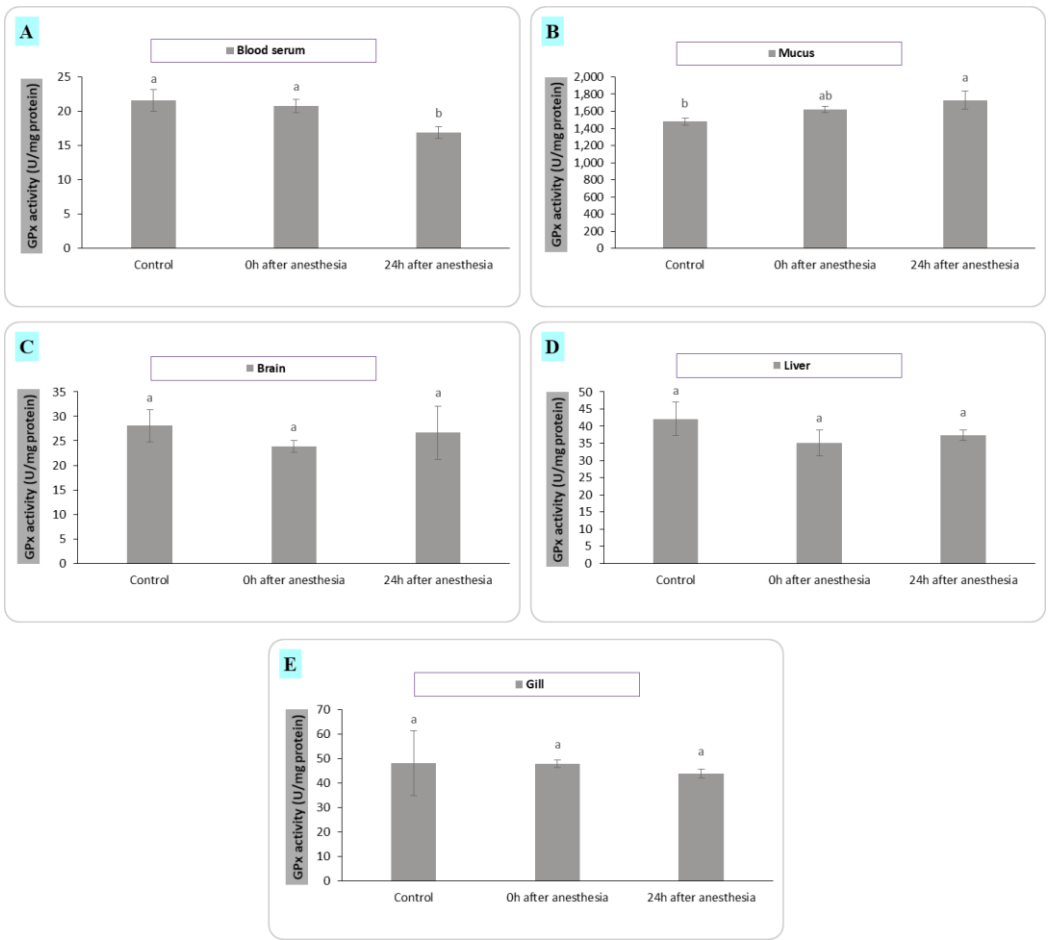
۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج نمایش داده در شکل ۳ که میزان فعالیت آنزیم CAT در بافت‌های مختلف را برحسب واحد بین‌الملل بر میلی‌گرم پروتئین (U/mg protein) مقایسه می‌کند، این ماده بیهوشی در زمان صفر (بلافاصله پس از بیهوشی) سبب افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) سطح آنزیم کاتالاز در بافت کبد (D -۳) در مقایسه با ماهیان گروه شاهد شده است. ولی در این زمان سطح آنزیم کاتالاز در بافت‌های سرم (A -۳)، موکوس (B -۳)، مغز (C-۳) و آبشش (E -۳) در مقایسه با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار نشان نداد ($p>۰/۰۵$). سطح آنزیم کاتالاز ۲۴ ساعت پس از بیهوشی نسبت به گروه شاهد در تمامی بافت‌ها به‌جز موکوس روند کاهشی نشان داد؛ ولی این روند در موکوس به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در مقایسه با گروه شاهد افزایشی بود. با مقایسه سطح آنزیم کاتالاز در بافت‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در هر سه تیمار (شاهد، بلافاصله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی)، بالاترین میزان آنزیم برحسب واحد بین‌الملل بر میلی‌گرم پروتئین (U/mg protein) در موکوس ۲۲۴/۹۷±۲۸/۶۴ ($p<۰/۰۵$) و پایین‌ترین سطح آن در سرم ۳/۰۶±۰/۱۱ خون مشاهده ($p<۰/۰۵$) می‌گردد (شکل ۳).



شکل ۳: تغییرات سطح آنزیم کاتالاز (CAT) در بافت‌های مختلف ماهیان بیهوشی شده با ۲-فنوکسی اتانول بلافاصله و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی

Figure 3: Catalase (CAT) enzyme level changes in different tissues of anesthetized fish with 2-phenoxyethanol immediately and 24 hours after anesthesia

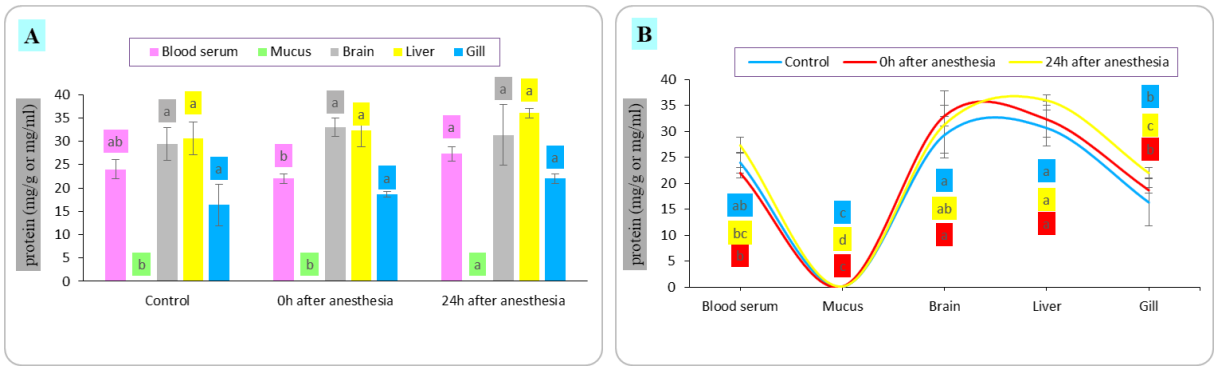
مقایسه فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) در بافت‌های مختلف بدن (سرم خون، موکوس، مغز، کبد و آبشش) در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بیهوش شده با حداقل دوز بیهوش‌کننده ۲-فنوکسی اتانول بلافاصله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی با ماهیان گروه شاهد در شکل ۴ نشان داده شده است. بر اساس نتایج نمایش داده در شکل ۴ که میزان فعالیت آنزیم GPx در بافت‌های مختلف را بر اساس واحد بین‌الملل بر میلی‌گرم پروتئین (U/mg protein) مقایسه می‌کند، بیهوشی با ۲- فنوکسی اتانول سبب کاهش سطح آنزیم GPx در زمان صفر (بلافاصله پس از بیهوشی) در سرم خون، مغز، کبد و آبشش در مقایسه با ماهیان گروه شاهد شده است و در مقابل افزایش سطح این آنزیم در موکوس شده است ($p<۰/۰۵$). سطح آنزیم GPx، ۲۴ ساعت پس از بیهوشی در بافت موکوس افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) نسبت به گروه شاهد نشان داد؛ ولی سطح این آنزیم در سرم کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) نشان داد. با توجه به شکل ۴، مقایسه سطح آنزیم GPx در بافت‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان می‌دهد که در هر سه تیمار (شاهد، بلافاصله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی) بالاترین میزان آنزیم GPx بر حسب واحد بین‌الملل بر میلی‌گرم پروتئین (U/mg protein) در موکوس ۱۷۳۰/۳۱±۱۰۲/۵۹ ($p<۰/۰۵$) و پایین‌ترین سطح آن در سرم خون ۱۶/۹۰±۰/۸۷ مشاهده ($p<۰/۰۵$) می‌گردد (شکل ۴).



شکل ۴: تغییرات سطح آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) در بافت‌های مختلف ماهیان بیهوشی شده با ۲-فنوکسی اتانول بلافاصله و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی

Figure 4: Glutathione peroxidase (GPx) enzyme level changes in different tissues of anesthetized fish with 2-phenoxyethanol immediately and 24 hours after anesthesia

میزان پروتئین در بافت‌های مختلف بدن (سرم خون، موکوس، مغز، کبد و آبشش) در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بیهوش شده با حداقل دوز بیهوش‌کننده ۲-فنوکسی اتانول بلافاصله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی با ماهیان گروه شاهد (که بیهوشی در آنها اعمال نشد) در شکل ۵ نشان داده شده است. با توجه به شکل ۵-A که میزان فعالیت آنزیم پروتئین در بافت‌های مختلف را بر اساس میلی‌گرم بر گرم (برای مغز، کبد و آبشش) یا میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (موکوس و سرم خون) (mg/g or mg/ml) مقایسه می‌کند، بیهوشی با ۲- فنوکسی تغییر معنی‌داری بر میزان پروتئین در بافت‌های مختلف در مقایسه با ماهیان گروه شاهد ایجاد نکرد؛ تنها در مورد بافت موکوس افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) سطح پروتئین را در فاصله ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی در مقایسه با گروه شاهد به‌همراه داشت. در شکل ۵-B مقایسه سطح پروتئین در بافت‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان می‌دهد که در هر سه تیمار (شاهد، بلافاصله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی) بالاترین میزان پروتئین در بافت کبد ($p<۰/۰۵$) ۳۶/۰۰±۱/۰۰ و پایین‌ترین سطح در موکوس ۰/۱۰±۰/۰۰ ($p<۰/۰۵$)، مشاهده می‌گردد (شکل ۵).



شکل ۵: تغییرات سطح پروتئین در بافت‌های مختلف ماهیان بیهوشی شده با ۲-فنوکسی اتانول بلافاصله و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی

Figure 5: Protein level changes in different tissues of anesthetized fish with 2-phenoxyethanol immediately and 24 hours after anesthesia

بحث

با توجه به این‌که بر حسب نوع گونه، جنسیت، سن و اندازه ماهی عکس‌العمل آن در برابر یک داروی بیهوشی می‌تواند کاملاً متفاوت و غیرقابل‌پیش‌بینی نسبت به سایر ماهیان باشد، تعیین دوز مناسب بیهوشی برای هر گونه، جنس، سن و اندازه در ماهیان ضرورت دارد. در مطالعه حاضر نیز در ابتدا کمترین دوز بیهوش‌کننده (حداقل غلظتی که ماهیان را در کمتر از ۳ دقیقه به مرحله بیهوشی سبک می‌رساند)، داروی ۲-فنوکسی اتانول برای ماهیان تعیین شد. نتایج نشان داد با استفاده از ۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر ۲-فنوکسی اتانول به صورت متوسط در ۱۷۲/۰۰±۱۴/۵۲ ثانیه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن ۵/۸۲±۰/۸ گرم را می‌توان بیهوش کرد. همچنین بازگشت ماهیان بیهوش شده با این غلظت از دارو بدون بروز هرگونه تلفات و عوارض جانبی ظاهری در کمتر از ۵ دقیقه (به طور میانگین ۱۹۲/۳۳±۸/۵۰ ثانیه) اتفاق افتاد. ۲- فنوکسی اتانول در گونه‌های مختلف ماهیان با غلظت‌های مختلفی (۱/۲-۰/۶ میلی‌لیتر در لیتر) به منظور تسکین و القاء بیهوشی به‌کار گرفته می‌شود. علاوه بر عواملی نظیر نوع گونه و اندازه ماهیان، سطح بیهوشی موردنظر (تسکین، بیهوشی سبک، بیهوشی عمیق) و دمای آب حمام بیهوشی نیز بر اثربخشی غلظت به‌کار گرفته شده مؤثر است. اما معمولاً در دوزهای ۰/۴-۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر برای القاء بیهوشی سریع و کوتاه‌مدت استفاده می‌گردد و در مقابل از دوزهای پایین‌تر (۰/۲-۰/۱ میلی‌لیتر در لیتر) به منظور تسکین در مدت‌زمان‌های طولانی (نظیر عملیات حمل ماهیان) بهره گرفته می‌شود (Coyle *et al.*, 2004). در مطالعه Velisek و Svobodava (۲۰۰۴) نیز همانند مطالعه حاضر دوز، مناسب ۲- فنوکسی اتانول برای بیهوشی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با متوسط وزن ۱۳/۲۵ گرم ۰/۳ میلی‌لیتر در

لیتر تعیین شد. در مطالعه‌ای دیگر نیز محققین غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۴ میلی‌لیتر در لیتر ۲- فنوکسی اتانول را مناسب برای القاء بیهوشی در ماهیان بالغ و غلظت ۰/۲۵ میلی‌لیتر در لیتر را مناسب برای بیهوشی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تشخیص دادند (Barton and Helfrich, 1981). Noga (۱۹۹۶) نیز غلظت ۰/۴-۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر را برای القاء بیهوشی در ماهیان توصیه کرده است که همگی با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر همسو هستند. اما در برخی مطالعات از غلظت‌های پایین‌تر ۲-فنوکسی اتانول (۰/۲ میلی‌لیتر در لیتر) برای بیهوشی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (با وزن ۱۸۰ گرم) استفاده شده است (Ucar and Atamanalp, 2010).

با قرارگیری ماهیان در حمام بیهوشی حاوی ۲-فنوکسی اتانول، انتقال داروی بیهوشی از مسیر پوست و آبشش‌ها به جریان خون و در نهایت اعصاب مرکزی صورت می‌گیرد. با تحلیل مسیر ورود می‌توان تأثیر عوامل مختلف تأثیرگذار بر نوسان دوزهای توصیه در ماهیان مختلف مانند نوع گونه ماهی در میزان دوز موردنیاز به‌واسطه ساختار و سطح جذبی که آبشش هر گونه ماهی برای ورود داروی بیهوشی در اختیار قرار می‌دهد، میزان حجم خون در بدن هر گونه و سرعت گردش خون (که علاوه بر ویژگی‌های فیزیولوژیک، دمای آب نیز بر آن اثرگذار است) و میزان متابولیسم گونه، ساختار و جنس پوست، فلس و نفوذپذیری آن را بهتر درک کرد. از سوی دیگر، تحلیل نقش اندازه ماهی نیز به‌واسطه سطح مقطعی که در پوست و آبشش در اختیار ماهی برای جذب داروی بیهوشی قرار می‌دهد و تفاوت در میزان تکاملی که در سنین مختلف در این دو بافت در یک‌گونه و جنس مختلف اتفاق می‌افتد، از پیگیری مسیر ورود داروی بیهوشی نیز ممکن می‌گردد. عوامل مذکور در کنار عواملی که تعیین‌کننده قدرت دفع و متابولیسم ماهی هستند، در مدت بیهوشی ماهی اثرگذار هستند. این عوامل می‌توانند درونی (با توجه به گونه، جنس و سن ماهی) یا بیرونی (دمای آب، شوری آب و سایر پارامترهای آب) باشد و دفع داروی بیهوشی از بدن ماهی را تسریع یا به تأخیر بیندازند. بر اساس نتایج مطالعه Imamura-Kojima و همکاران (۱۹۸۷) نیمه‌عمر زیستی ۲-فنوکسی اتانول در بدن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۳۰ دقیقه عنوان شده است و دفع دارو نیز عمدتاً از مسیر آبشش اتفاق می‌افتد. با رسیدن ۲-فنوکسی اتانول به سیستم عصبی ماهی، این ماده از طریق ایجاد یک انبساط در دیواره سلول‌های عصبی در نواحی فوقانی سیستم عصبی و فعال‌سازی گیرنده‌های ان- متیل- دی- آسپارتات (NMDA) میزان تحریک‌پذیری سلول‌های عصبی را با کمک کاهش آستانه تحریک پتانسیل عمل (از طریق گشودن کانال‌های یونی عامل نفوذ پیوندهای دارای بار مثبت نظیر کلسیم، سدیم و پتاسیم) افزایش می‌دهد. از سوی دیگر، مهار گیرنده‌های مذکور در القاء بی‌حسی در ماهی نقش دارد (Grasshoff *et al*., 2006).

سوپر اکسید دیسموتاز آنزیمی است که دیسموتاسیون سوپر اکسید به هیدروژن پروکسید (Cheeseman and Slater, 1993) که در ادامه به‌وسیله کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) دفع می‌شود (Li *et al*., 2009)، تسریع (کاتالیز) می‌کند. نتایج این مطالعه نشان داد که بعد از ۲۴ ساعت از القاء بیهوشی در ماهیان، میزان فعالیت آنزیم SOD در آبشش، مغز و کبد ماهیان در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت؛ اما این کاهش در بافت موکوس و خون مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد که اندام‌های اصلی ماهی در مسیر ورود، جذب و دفع ۲- فنوکسی اتانول بیش از سایر بافت‌های موردمطالعه تحت‌تأثیر رادیکال‌های آزاد تولیدی و استرس اکسیداتیو ناشی از دارو بیهوشی قرار گرفته‌اند و علت کاهش فعالیت آنزیم مذکور را می‌توان مصرف آن در مسیر مهار ROSs تولیدی ناشی از ۲-فنوکسی اتانول دانست، نتایجی که پیش‌تر نیز در مطالعاتی که اثرات اکسیدانی ۲- فنوکسی اتانول در آنها مورد ارزیابی قرار گرفته بود، تأیید شده است به‌طوری‌که در گروه‌هایی که در معرض درصدهای بالاتری از ۲-فنوکسی اتانول قرار گرفته بودند، میزان کاهش آنزیم SOD شدیدتر گزارش شد (Akgündüz *et al*., 2020). همچنین در مطالعه Velisek و همکاران (۲۰۱۱) نیز کاهش معنی‌دار سطح آنزیم SOD در بافت مغز ماهیان تحت‌تأثیر ماده بیهوشی در مقایسه با گروه کنترل گزارش شده است. همچنین کاهش غیرمعنی‌دار سطح آنزیم در بافت آبشش در مطالعه مذکور گزارش شده که بعد از ۲۴ ساعت بهبود پیدا کرده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افت

شدید میزان SOD در بافت مغز ماهیان، ۲۴ ساعت پس از بیهوشی تا حدودی بهبود پیدا کرده و با عبور از بحران هجوم اکسیدان‌ها، سیستم آنتی‌اکسیدانی موفق به احیاء خود شده است. اما در مطالعه Velisek و همکاران (۲۰۱۱) سطح آنزیم بعد از گذشت ۲۴ ساعت از بیهوشی همچنان سیر نزولی داشته است. از آن‌جایی‌که سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی دارای سطوح دفاعی مختلفی است و ضعف در یک سطح می‌تواند فشار را بر سایر سطوح دفاعی مضاعف کند، دلیل تفاوت نتایج مطالعه حاضر با مطالعه Velisek و همکاران (۲۰۱۱) را می‌توان شرایط متفاوت ماهیان در سایر سطوح دفاع آنتی‌اکسیدانی جستجو کرد. برای مثال، آنتی‌اکسیدان‌های با منشاء تغذیه‌ای (ویتامین‌های C، E و A، گلوتاتیون، اسیداوریک، GSH و لیپوئیک اسید)، مواد معدنی (روی، سلنیوم، مس، منگنز و آهن) و پروتئین‌های کلات کننده فلزی (فریتین، لاکتوفرین، آلبومین، سرولوپلاسمین) می‌توانند با مهار بخشی از رادیکال‌های آزاد تولیدی در بدن ماهی، ظرفیت تحمل ماهی را در مقابل اکسیدان‌ها افزایش دهد و به مصرف کمتر سایر لایه‌های دفاعی شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر آنزیم SOD کمک کند.

بررسی تغییرات آنزیم کاتالاز در بافت‌های مختلف ماهیان بیهوش شده نشان داد که سطح این آنزیم بلافاصله بعد از بیهوشی در بافت‌های مغز و کبد به شکل معنی‌داری افزایش‌یافته، ولی ۲۴ ساعت پس از بیهوشی کاهش و به شرایط طبیعی نزدیک‌تر شده است. با توجه به این‌که آنزیم کاتالاز عمدتاً در پروکسی‌زوم‌ها قرار دارد و مسئول کاهش هیدروژن پروکسید تولیدی از متابولیسم اسیدهای چرب بلند زنجیره در پروکسی‌زوم‌هاست که این آنزیم پیش‌تر به‌وسیله خط دفاعی قبلی (مثل SOD) از سوپر اکسیدها تولید شده، فرصت عکس‌العمل بهتری نسبت به آنزیم SOD داشته و در نهایت با مهار بحران (کنترل هیدروژن پروکسیدها) سطح آنزیم به سمت نرمال شدن پیش رفته است. تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش سطح آنزیم کاتالاز در مواجهه با ۲-فنوکسی اتانول در مطالعه Akgündüz و همکاران (۲۰۲۰) نیز مورد تأکید قرار گرفته است.

بررسی تغییرات سطح آنزیم GPx در ماهیان بیهوش شده نشان داد که در بافت مغز بلافاصله بعد از بیهوشی افت میزان آنزیم اتفاق افتاده، ولی ۲۴ ساعت پس از بیهوشی افزایش و به حالت طبیعی برگشته است. کاهش میزان سطح این آنزیم در سرم خون تا ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی ادامه داشته، اما در بافت‌های کبد، آبشش و موکوس ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی افزایش سطح آنزیم GPx نسبت به ماهیان گروه شاهد رخ داده است. در مطالعه Velisek و همکاران (۲۰۱۱) نیز مشابه نتایج این پژوهش افت سطح آنزیم GPx در مغز بلافاصله بعد از بیهوشی رخ داده که بعد از ۲۴ ساعت سطح این آنزیم کمی افزایش‌یافته است. در مورد کبد نیز مانند مطالعه حاضر، افزایش سطح این آنزیم در کبد رخ‌داده، اما در مورد آبشش برخلاف نتایج مطالعه حاضر، سطح آنزیم کاهش داشته که ۲۴ ساعت پس از بیهوشی نیز این کاهش ادامه داشته است (Velisek *et al.*, 2011). از آن‌جایی‌که برخلاف آنزیم کاتالاز، آنزیم GPx کاهش هیدروژن پروکسید و پروکسید چربی را کاتالیز می‌کند، کاهش در میزان فعالیت GPx در این مطالعه می‌تواند نشان دهد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌وسیله سطح هیدرو - پروکسیدهای تولیدی مصرف شده است و نشانه‌ای از شکست احتمالی سیستم آنتی‌اکسیدانی ماهیان بیهوش شده در بافت‌های مذکور باشد. به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که داروی بیهوشی ۲-فنوکسی اتانول موجب مهار ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی احتمالاً از طریق افزایش شکل‌گیری ROSs و در نتیجه، آسیب اکسیداتیو می‌شود. مقایسه نتایج ارزیابی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های مختلف در ماهیان بیهوش شده و تفاوت آشکار در سیر نزولی یا صعودی این آنزیم‌ها در بافت‌های مختلف مذکور نشان می‌دهد که استفاده از روش غیرتهاجمی (نمونه‌های موکوس یا خون) برای بیان وضعیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با داروی بیهوشی ۲-فنوکسی اتانول مناسب نیست.

تشکر و قدردانی

این طرح (با شماره طرح:PR-RIOZ-1401-1) با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری پژوهشگاه زابل انجام شده است.

منابع

Akbary, P., Pirbeigi, A. and Jahanbakhshi, A., 2016. Analysis of primary and secondary stress responses in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) by anesthetization with 2-phenoxyethanol.*International Journal of Environmental Science and Technology*, 13: 1009– 1016. Doi:10.1007/s13762-015-0923-x

Akgündüz, M.Ç., Çavuşoğlu, K. and Yalçın, E., 2020. The potential risk assessment of phenoxyethanol with a versatile model system. *Scientific Reports*, 10(1): 1-10. Doi:10.1038/s41598-020-58170-9

Anderson, H.R., Nileson, J., Nielson, F. and Grandsean, P., 1997. Antioxidative enzyme activities erythrocyte. *Clinical chemistry*, 43(4): 552-556. Doi:10.1093/clinchem/43.4.562

Barbaneagra, T., Cristica, M., Ciornea, E. and Manoliu, A., 2012. Influence of nutritive substrate and pH on Catalase and Peroxidase production in Saprophytic Fungus *Rhizopus nigricans*. *Journal of Experimental and Molecular Biology*, 13(3): 71 -76.

Barton, B.A. and Helfrich, H., 1981. Time dose responses of juvenile rainbow trout to 2-phenoxyethanol. *The Progressive Fish-Culturist*, 43(4): 223–231. Doi:10.1577/1548-8659(1981)43%5b223: TROJRT%5d2.0.CO;2

Barton, B.A. and Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of fish diseases*, 10: 3–26. Doi:10.1016/0959-8030(91)90019-G

Bell, G.R., 1964. A guide to properties, characteristics, and uses of some general anaesthetics for fish. *Bulletin of Fisheries Research Board of Canada*, 148: 1–4.

Berlinsky, D.L., Watson, M.T., DiMaggio, M.A. and Breton, T.S., 2016. The use of tricaine methane sulfonate, clove oil, metomidate, and 2-phenoxyethanol for anesthesia induction in alewives. *North American Journal of Aquaculture*, 78: 84–91. Doi:10.1080/15222055.2015.1105891

Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S. and Kalayci, O., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*, 5: 9. Doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613

Cazenave, J., Bistoni, M.D.A., Pesce, S.F. and Wunderlin, D.A., 2006. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquatic toxicology*, 76: 1–12. Doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.011

Cheeseman, K.H. and Slater, J.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. In: Cheeseman, K.H. and Slater, T.S. (Eds.), Free Radicals in Medicine. Churchill Livingstone, New York. pp 481–493. Doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625

Coyle, S.D., Durborow, R.M. and Tidwell, J.H., 2004. Anesthetics in Aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center Publication no. 3900, 6 P.

Faggio, C., Tsarpali, V. and Dailianis, S., 2018. Mussel digestive gland as a model for assessing xenobiotics: an overview. *Science of the total environment*, 613: 220–229. Doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.264.

FAO FishStat, 2023. Global aquaculture production Quantity (1950 - 2020): Rainbow trout. Available at https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/aquaculture/aquaculture_ quantity[data downloaded march 2023]

Filiciotto, F., Buscaino, G., Buffa, G., Bellante, A., Maccarrone, V. and Mazzola, S., 2012. Anaesthetic qualities of eugenol and 2-phenoxyethanol and their effect on some haematological parameters in farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11: 494–502. Doi:10.3923/javaa.2012.494.502

Gharaei, A., Khajeh, M., Khosravanizadeh, A., Mirdar, J. and Fadai, R., 2020. Fluctuation of biochemical, immunological, and antioxidant biomarkers in the blood of beluga (*Huso huso*) under effect of dietary ZnO and chitosan–ZnO NPs. *Fish physiology and biochemistry*, 46(2): 547-561. Doi:10.1007/s10695-019-00726-2

Grasshoff, C., Drexler, B., Rudolph, U. and Antkowiak, B., 2006. Anaesthetic drugs: linking molecular actions to clinical effects. *Current pharmaceutical design*, 12: 3665–3679. Doi:10.2174/138161206778522038

Halliwell, B. and Gutteridge, J., 2007. Antioxidant defences: endogenous and diet derived, Free radicals in biology and medicine, 4th edn. Oxford University Press Inc, New York, USA, 79–186 P.

Imamura-Kojima, H., Takashima, F. and Yoshida, T., 1987. Absorption, distribution and excretion of 2-phenoxyethanol in rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*, 53: 1339–1342. Doi:10.2331/suisan.53.1339

Jafarinejad, R., Gharaei, A. and Mirdar Harijani, J., 2020. Dietary ginger improve growth performance, blood parameters, antioxidant capacity and gene expression in *Cyprinus carpio*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(3): 1237-1252. Doi:10.22092/ijfs.2018.119876

Keene, J.L., Noakes, D.L.G., Moccia, R.D. and Soto, C.G., 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhyncus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29: 89–101. Doi:10.1046/j.1365-2109.1998.00927.x

Khosravanizadeh, A., Ghafari, M., Khajeh, M., Abtahi, B., Salehi, H., Zakipour-Rahimabadi, E. and Ahmadipour-Nezamabadi, K., 2012. Using clove oil (*Eugenia caryophillata*) loaded on the iron nanoparticles to induce anesthesia in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 20(4): 43-52. Doi: 10.22092/ISFJ.2017.110022

Li, Z.H., Xie, S., Wang, J.X., Sales, J., Li, P. and Chen, D.Q., 2009. Effect of intermittent starvation on growth and some antioxidant indexes of *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Aquaculture Research*, 40: 526–532. DOI:10.1111/j.1365-2109.2008.02123.x

Molinero, A. and Gonzalez, J., 1995. Comparative effects of MS 222 and 2-phenoxyethanol on gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) during confinement. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 111: 405–414. Doi:10.1016/0300-9629(95)00037-8

Noga, E.J., 1996. Fish disease: Diagnosis and treatment. First edition. Wiley-Blackwell, Iowa, USA. 544 P. Doi:10.1002/9781118786758

Priborsky, J., Stara, A., Rezabek, J., Zuskova, E., Lepic, P. and Velisek, J., 2015. Comparison of the effect of four anesthetics on haematological profile, oxidative stress and antioxidant enzymes in barbel (*Barbus barbus*). *Neuroendocrinology Letters*, 36(1): 141–146.

Priborsky, J. and Velisek, J., 2018. A review of three commonly used fish anesthetics. *Reviews in fisheries science & aquaculture*, 26(4): 417-442. Doi:10.1080/23308249.2018.1442812

Ross, L.G. and Ross, B., 1999. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. Second Edition. Blackwell Science Ltd., Oxford. UK.159 P.

Ross, N.W., Firth, K.J., Wang, A., Burk,a J.F. and Jojnson, S.C., 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin mucus due to infection with the Salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and cortisol implantation. *Disease of Aquatic Organisems*, 41: 43-51. Doi:10.3354/dao041043

Salehi, H. and Khosravanizadeh, A., 2010. An analysis of final costs components in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) farming sector in Iran. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 19(2): 101-114. Doi:10.22092/ISFJ.2017.109946

Schmuck, G., Steffens, W. and Bomhard, E., 2000. 2-Phenoxyethanol: a neurotoxicant? *Archives of Toxicology*, 74: 281–287. Doi:10.1007/s002040000110

Sehonova, P., Tokanova, N., Hodkovicova, N., Kocour Kroupova, H., Tumova, J., Blahova, J., Marsalek, P., Plhalova, L., Doubkova, V., Dobsikova, R., Chloupek, P., Dolezalova, P., Faldyna, M., Svobodova, Z. and Faggio, C., 2019. Oxidative stress induced by fluoroquinolone enrofloxacin in zebrafish (*Danio rerio*) can be ameliorated after a prolonged exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 67: 87-93. Doi:10.1016/j.etap.2019.02.002

Svacina, P., Priborsky, P., Blecha, M., Policar, T. and Velisek, J., 2016. Haematological and biochemical response of burbot (*Lotalota* L.) exposed to four different anaesthetics. *Czech Journal of Animal Science*, 61: 414–420. Doi:10.17221/14/2016-CJAS

Tubío, R.C., Weber, R.A., and Aldegunde, M., 2010. Home tank anesthesia: a very efficient method of attenuating handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Ichthyology*, 26(1): 116-117. Doi:10.1111/j.1439-0426.2009.01244.x

Ucar, A. and Atamanalp, M., 2010. The effects of natural (clove oil) and synthetical (2-phenoxyethanol) anesthesia substances on hematology parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta fario*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9: 1925–1933. Doi:10.3923/javaa.2010. 1925.1933

Velisek, J. and Svobodova, Z., 2004. Anaesthesia of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with 2-phenoxyethanol: acute toxicity and biochemical blood profile. *Acta Veterinaria Brno*, 73: 379– 384. Doi:10.2754/avb200473030379

Velisek, J., Stejskal, V., Kouril, J. and Svodobova, Z., 2009. Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profiles of perch. *Aquaculture Research*, 40: 354–361. Doi:10.1111/j.1365-2109.2008.02102.x

Velisek, J., Stara, A., Li, Z. H., Silovska, S. and Turek, J., 2011. Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profile and oxidative stress biomarkers of rainbow trout. *Aquaculture*, 310: 369–375. Doi:10.1016/j.aquaculture.2010.11.010

Wagner, T. and Congleton, J.L., 2004. Blood chemistry correlates of nutritional condition, tissue damage, and stress in migrating juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61: 1066–1107. Doi:10.1139/f04-050

Zelen, I., Mitrovic, M., Jurisic-Skevini, A. and Arsenijevic, S., 2010. Activity of SOD and Catalase and MDA content in seminal plasma of infertile patients. *Medicinski pregled*, 63(9-10): 624-629. Doi:10.2298/MPNS1010624Z

Zhang, X., Shan, P., Sasidhar, M., Chupp, G.L., Flavell, R.A., Choi, A.M.K. and Lee, P.J., 2003. Reactive oxygen species and extracellular signal regulated kinase 1/2 mitogenactivated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 28: 305–315. Doi:10.1165/rcmb.2002-0156OC

Zhang, X., Yang, F., Zhang, X., Xu, Y., Liao, T., Song, S. and Wang, H., 2008. Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to water borne hexabromocyclododecane (HBCDD). *Aquatic Toxicology*, 86: 4–11. Doi:10.1016/j.aquatox.2007.07.002

Effect of 2-phenoxyethanol on antioxidant enzymes capacity in the various tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Khosravanizadeh A.[1*]; Rahdari A.[1]; Pakzad Toochaei S.[2]

[*]Khosravani.ali@uoz.ac.ir

1-Department of Aquatic sciences, Hamoun International Wetland Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran.
2- Department of Natural Ecosystems, Hamoun International Wetland Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran.

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of 2-phenoxyethanol on antioxidant enzymes capacity including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) in various tissues (blood, mucus, brain, gill, and liver) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at immediately and 24 h after induction anesthesia. First, the fish (n=180, with an average weight of 5.82±0.8) were divided into six groups (each group with 3 repetitions) and exposed to 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, and 0.6 mL/L of 2-phenoxyethanol for the determination of its lowest concentration for inducing anesthesia. The minimum concentration for anesthesia was determined 0.3 mL/L. Then, 72 fish (with an average weight of 5.79±0.73) were assigned to control and experiment groups (36 fish in each group) to evaluate the effect of this concentration of anesthetic on antioxidant enzymes capacity in various tissues of rainbow trout. The samples of blood serum, mucus, and tissue extract (brain, gill, and liver) were prepared from fish in each group, along with measuring various enzymes (SOD, CAT, and GPx) and protein, at 0 (immediately after anesthesia) and 24 h (after induction anesthesia). The results showed that the anesthetic 2-phenoxyethanol inhibited the antioxidant capacities in different tissues, probably through the increase of reactive oxygen species (ROS) and oxidative damage. The comparing the results of the capacity of antioxidant enzymes in different tissues of rainbow trout anesthetized with 2-phenoxyethanol and the obvious difference in the downward or upward course of these enzymes shows that the non-invasive method (mucus and blood samples) to express the status of the antioxidant defense system of rainbow trout is not suitable when faced with the anesthetic 2-phenoxyethanol.

Keywords: Superoxide dismutase, Catalase, Glutathione peroxidase, Oxidative stress, Rainbow trout

[*]Corresponding author