



مقاله علمی - پژوهشی:

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

علی خسروانی‌زاده^{*}، 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 پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۲ تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۱

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 بلافارسله و ۲۴ ساعت پس از بیهوشی صورت گرفت. ابتدا تعداد ۱۸۰ عدد ماهی با میانگین وزن $۵/۸۲ \pm ۰/۸$ 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 بیهوش کنندگی 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 $۵/۷۹ \pm ۰/۷۳$ 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 بیهوش شده با ۲-فنوکسی اتانول و تفاوت آشکار در سیر نزولی یا صعودی این آنزیم‌ها نشان می‌دهد که روش غیرتھاجمی (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

*نوبنده مسئول

مقدمه

کائین متان سولفونات (Tubio *et al.*, 2010)^۳ (MS222) و اسانس گل میخ (Khosravanzadeh *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 بیهوش کننده 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) و نشانگرهای زیستی استرس اکسیداتیو (*Velisek et al.*, 2011) و آنژیم‌های آنتی‌اکسیدانی (*Priborsky et al.*, 2015) 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 (Molinero and Gonzalez, 1995) یا لاکتات (*Velisek et al.*, 2009) بعد از بیهوشی گردیده است. پیش‌ازاین در محدود مطالعاتی، اثر بیهوشی با ۲-فنوکسی اتانول بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال، ۲-فنوکسی اتانول در غلظت $4/۰$ 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 (2015) 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.

به کارگیری 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 مورد استفاده 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 زمانی که ماهی تحت استرس قرار دارد، رخ می‌دهد (Barton and Iwama, 1991) تغییر در سطح هورمون‌های موجود در پلاسمای تغییر متابولیسم انرژی و تغییر در تعادل الکتروولیت‌ها هستند. پرورش‌دهندگان و زیست‌شناسان ماهی از شاخص‌های شیمی خون به منظور ارزیابی پاسخ‌های ماهی به استرس، وضعیت تنفسی، کیفیت مولد، آسیب بافتی در عملیات دست‌کاری و شرایط سلامت ماهی بهره می‌برند (Wagner and Congleton, 2004). در ماهی همانند سایر جانداران هوایزی، 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 در بردارنده سازوکارهای آنژیمی و غیرآنژیمی است. این سیستم می‌تواند از شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که می‌توانند با ماکرومولکول‌های زیستی مستعد واکنش دهند و هیدروپراکسیداسیون 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^۱ (اتیلن گلایکول مونو فنیل اتر^۲ ($C_8H_{10}O_2$) 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

^۳ Tricaine Methanesulfonate (MS222)

^۱ 2-Phenoxyethanol

^۲ Ethylene glycol monophenyl ether

می‌تواند زمینه لازم را برای تشخیص غلطت‌های مناسب داروهای بیهودشی ایمن برای هر گونه از ماهیان فراهم سازد. با مروری بر تحقیقات انجام شده در زمینه بیهودشی ماهیان، کمبود مطالعات در خصوص اثرات جانبی بیهودش‌کننده‌های مورداستفاده در آبزی پروری بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان مشهود است. از سوی دیگر، با توجه به اهمیت ماهی Salehi (2010) و قزل‌آلای رنگین‌کمان در صنعت آبزی پروری کشور (and Khosravanzadeh, 2010 FAO FishStat, 2023)، ضرورت انجام این مطالعه دوچندان می‌گردد. در این تحقیق اثرات احتمالی بیهودشی با ۲-فنوکسی اتانول بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در بافت‌های مختلف ماهی برسی 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 بیهودش‌کننده 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 $5/82 \pm 0/8$ 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 به وسیله 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.

در شرایط نرمال فیزیولوژیک، حدود ۲ درصد از اکسیژن مصرفی به وسیله میتوکندری در زنجیره انتقال الکترون می‌توکنند. این به شکل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) آزاد می‌شود که می‌تواند به آسیب DNA، غیرفعال شدن آنزیم‌ها، آسیب اکسیداتیو به پروتئین‌های ساختاری و پراکسیداسیون Halliwell and Gutteridge (2007; Jafarinejad *et al.*, 2020) لیپیدهای غشاء منجر شود (Faggio *et al.*, 2018; Sehonova *et al.*, 2019). همچنین وقتی ماهیان در معرض عفونت‌های میکروبی، آلودگی‌ها، سم‌ها و آفت‌کش‌ها قرار گیرند، گونه‌های فعال اکسیژن شکل Faggio *et al.*, 2018; Sehonova *et al.*, 2019). استرس اکسیداتیو به واسطه شکل گیری ROSS مانند هیدروژن پروکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و رادیکال‌های آنیون سوپر اکسید که عمدتاً محصولات فرعی متabolیسم 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 به وسیله طیف گستردگی از آنتی‌اکسیدان‌ها مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (GPx, SOD, GST و CAT)، آنتی‌اکسیدان‌های با منشاء تغذیه‌ای (وبیتامین‌های 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، سرولوبلاسمین) کنترل می‌شوند (Gharaei *et al.*, 2020). با توجه به این که داروهای بیهودشی 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 بر جا گذارند، مطالعه تغییرات سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به عنوان یکی از مهم‌ترین سدهای دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان می‌تواند شاخص مفیدی برای ارزیابی ایمنی داروهای بیهودشی قلمداد شود. نظر به حضور این آنزیم‌ها در بافت‌های مختلف بدن، مطالعه در خصوص تعیین بهترین محل نمونه برداری که ضمن داشتن کمترین عوارض برای ماهی به نحو بهتری تغییرات را نشان دهد،

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 میلی لیتر در لیتر، به دست آمده 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 انداره‌گیری 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 به وسیله 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 به خوبی هوادهی می‌گردید، منتقل شدند و زمان‌های مربوط به مراحل مختلف بازگشت از بیهوشی شامل مراحل بازگشت تعادل و بازگشت واکنش‌پذیری نسبت به حرکت‌های خارجی (احیا کامل) بادقت ثبت گردید (جدول ۱) (Keene *et al.*, 1998).

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، ۰/۴، ۰/۳، ۰/۲ و ۰/۱ میلی لیتر 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 به دست آمده 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 به وسیله کرنومتر ثبت شد، تا پس از محاسبات آماری کمترین غلظت لازم برای بیهوشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به دست آید. سایر ماهیان (۷۲) با میانگین وزنی $5/79 \pm 0/73$ گرم به صورت تصادفی در ۲ گروه و با ۱۲ تکرار (در هر تکرار ۱۲ عدد ماهی) جایابی شدند. گروه یک

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، واکنش پذیر نسبت به حرکت‌های لمسی قوی
القا بیهوشی سبک	ازدسترفتن کامل تونیسیته عضلات، عدم پاسخ‌گویی به حرکت‌های خارجی، ضربان قلب آهسته
بازگشت تعادل	بازگشت کامل تعادل، افزایش تعداد تنفس
احیا کامل	شنا عادی، واکنش پذیر نسبت به انواع حرکت‌های خارجی

پس از جدایکن سرسوزن در تیوب اپندورف شماره‌گذاری شده فاقد هپارین تخلیه گردید. نمونه‌های خون پس از لخته شدن به مدت ۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور گردش در دقیقه سانتریفیوژ شده، سرم خون به دست آمده 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 بادقت از بدن خارج و بادقت ۱ میلی‌گرم توزین شدند. به کمک

نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نیمی از ماهیان هر تکرار در گروه‌های آزمایش در ساعت صفر (بالاصله 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 سی سی خون از محل ورید ساقه دمی، در انتهای باله مخرجی به وسیله سرنگ ۱ سی سی استریل گرفته شد و

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

Shapiro-Wilk نرمال بودن داده‌ها استفاده از آزمون بررسی شد. پس از بررسی همگنی واریانس‌ها، جهت آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزارهای 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 $14/10 \pm 1/11$)، اسیدیته (به طور متوسط $8/30 \pm 0/27$)، میزان اکسیژن محلول (به طور متوسط $8/14 \pm 0/56$ میلی‌گرم در لیتر) و سختی آب (به طور متوسط $15/07 \pm 1/14$ 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 به دست آمده از معرض قرار دهی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با غلظت‌های مختلف ۲-فنوکسی‌اتانول و پارامترهای زمانی مختلف شامل مدت زمان ایجاد بیهوشی سبک و مدت زمان بازگشت واکنش‌پذیری نسبت به محرك‌های خارجی مانند ضربه‌زدن به شیشه آکواریوم (احیا کامل) به ترتیب در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده (شکل ۱)، کمترین غلظت ۲-فنوکسی‌اتانول برای ایجاد بیهوشی مطلوب در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان $0/3$ میلی‌لیتر در لیتر تعیین شد که به طور میانگین طی مدت زمان $14/52 \pm 1/17$ ثانیه موجبات بیهوشی ماهیان را فراهم کرد، متوسط زمان لازم برای احیاء و بازگشت واکنش‌پذیری ماهیان نسبت به محرك‌های خارجی (احیا کامل) در این غلظت $19/12 \pm 3/3$ ثانیه بود. بر اساس نتایج به دست آمده، غلظت ۲-فنوکسی‌اتانول با زمان مورد نیاز برای القا بیهوشی رابطه عکس و با مدت زمان لازم جهت بازگشت ماهیان از بیهوشی رابطه مستقیم داشت به طوری که با افزایش غلظت ۲-فنوکسی‌اتانول در محلول بیهوشی از $0/2$ به $0/6$ میلی‌لیتر در لیتر، زمان لازم برای رسیدن به مرحله بیهوشی سبک در ماهیان کاهش یافت. مدت زمان مورد نیاز برای القاء بیهوشی در غلظت

هموزنایزر یک محلول هموزن 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) فوکانی نمونه‌ها به منظور سنجش میزان آنزیم‌ها استفاده گردید (Velisek et al., 2011) 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 -۸ منقل گردید (Ross et al., 2000).

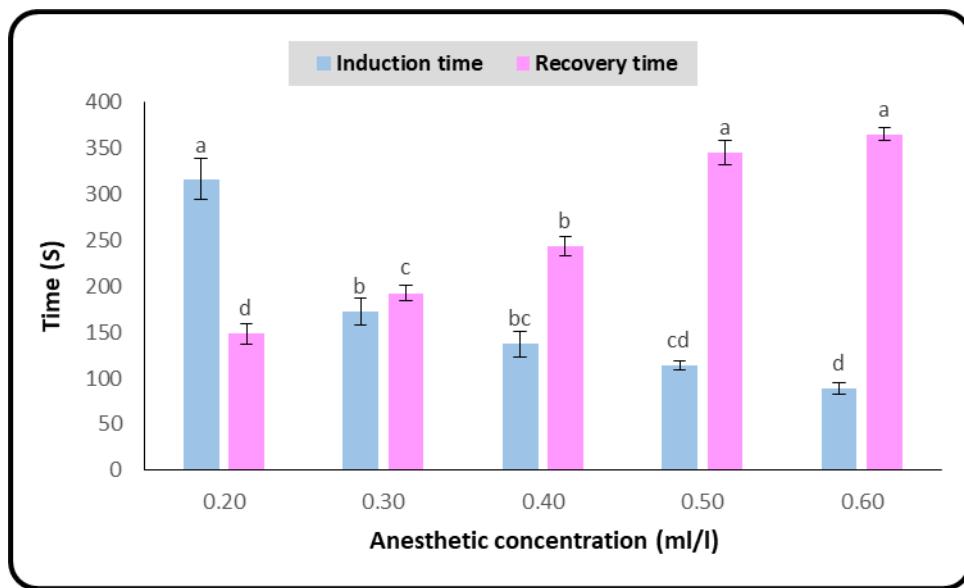
اندازه‌گیری متغیرها

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

سنجدش آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با بهره‌گیری از کیت شرکت پادگین طب از محصولات شرکت زلبوی آلمان (Zelbio, Germany) و به شیوه رنگ‌آمیزی و قرائت در طول موج 420 نانومتر صورت پذیرفت (Zelen et al., 2010). سنجدش آنزیم کاتالاز به وسیله کیت شرکت پادگین طب محصول زلبوی آلمان انجام شد. اندازه‌گیری به روش رنگ‌سنگی و با طول موج 405 نانومتر صورت گرفت (Barbaneagra et al., 2012; Zelen et al., 2010). 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 NADP به NADPH تبدیل گردید. با قرائت تغییرات در جذب NADPH در طول موج 412 نانومتر می‌توان سرعت تولید گلوتاتیون را سنجش نمود (Anderson et al., 1997).

اتanol) مدت زمان لازم برای بازگشت ماهیان از بیهوشی بیشتر شد به طوری که تفاوت این پارامتر برای حداقل و حداقل غلظت ۲-فنوکسی اتانول به کار برده شده در این تحقیق، به طور متوسط $216/66 \pm 16/44$ ثانیه و از نظر آماری اختلافی معنی دار ($p < 0.05$) بود (شکل ۱).

۰ میلی لیتر در لیتر (کمترین غلظت مورد استفاده) به طور متوسط $228/58 \pm 28/00$ ثانیه و به شکل معنی داری ($p < 0.05$) بیشتر از مدت زمان موردنیاز برای القاء بیهوشی در ماهیان در غلظت 0.06 میلی لیتر در لیتر (بیشترین غلظت مورد استفاده) بود. در خصوص زمان موردنیاز برای بازگشت از بیهوشی نیز با افزایش غلظت داروی بیهوشی (۲-فنوکسی



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

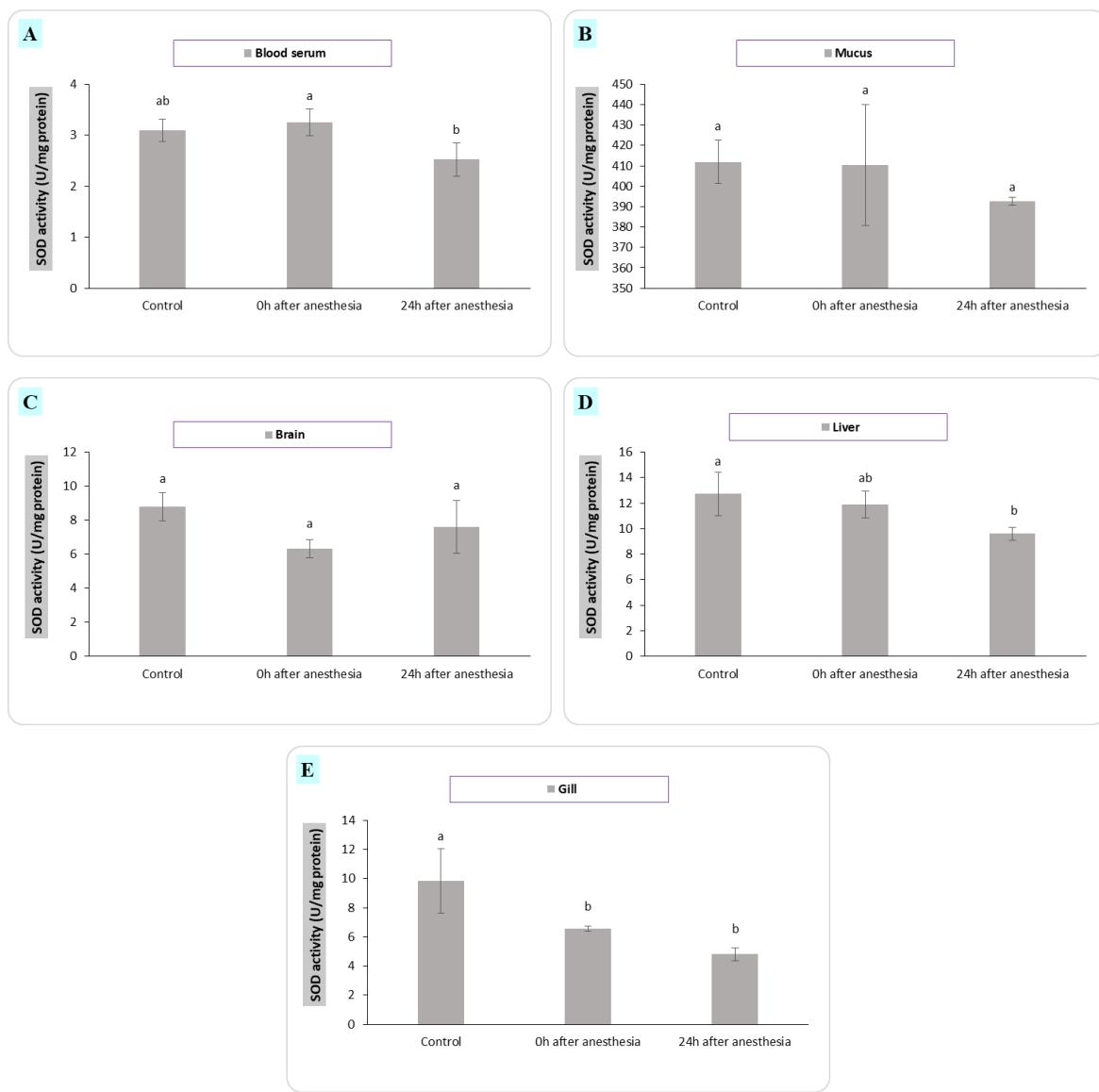
شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج نمایش داده در شکل ۲ که میزان فعالیت آنژیم SOD در بافت‌های مختلف را بر حسب واحد بین‌الملل بر میلی‌گرم پروتئین (U/mg protein) مقایسه می‌کند، بیهوشی با ۲-فنوکسی اتانول سطح آنژیم SOD در ماهیان را بلا فاصله بعد از بیهوشی و در فاصله ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی در بافت‌های کبد (شکل ۲-D) (در این بافت کاهش رخداده بلا فاصله بعد از بیهوشی معنی دار نبوده است)، مغز (شکل ۲-E) و آبشش (شکل ۲-C) در مقایسه با گروه شاهد به شکل معنی داری ($p < 0.05$) کاهش داده است. اما در سطح آنژیم SOD در بافت‌های خون (شکل ۲-A) و موکوس (شکل ۲-B) در مقایسه با ماهیان گروه شاهد تغییر معنی داری ($p > 0.05$) بین سه گروه مشاهده نشد. مقایسه سطح آنژیم SOD در بافت‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان می‌دهد که در هر

مشاهده رفتار ماهیان بیهوش شده در مدت ۹۶ ساعت پس از بیهوشی، بیانگر بی خطر بودن ۲-فنوکسی اتانول در غلظت‌های به کار 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 آنژیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در بافت‌های مختلف بدن (خون، موکوس، مغز، کبد و آبشش) در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بیهوش شده با حداقل دور بیهوش‌کننده ۲-فنوکسی اتانول (0.06 میلی لیتر در لیتر) بلا فاصله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی با ماهیان گروه شاهد که بیهوشی در آنها اعمال نشده بود، در

موکوس $411/85 \pm 10/64$ و پایین ترین سطح در سرم خون $3/09 \pm 0/22$ مشاهده شد (شکل ۲).

سه تیمار (شاهد، بلا فاصله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی) بالاترین میزان آنزیم SOD بر حسب واحد بین الملل بر میلی گرم پروتئین (U/mg protein) در



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

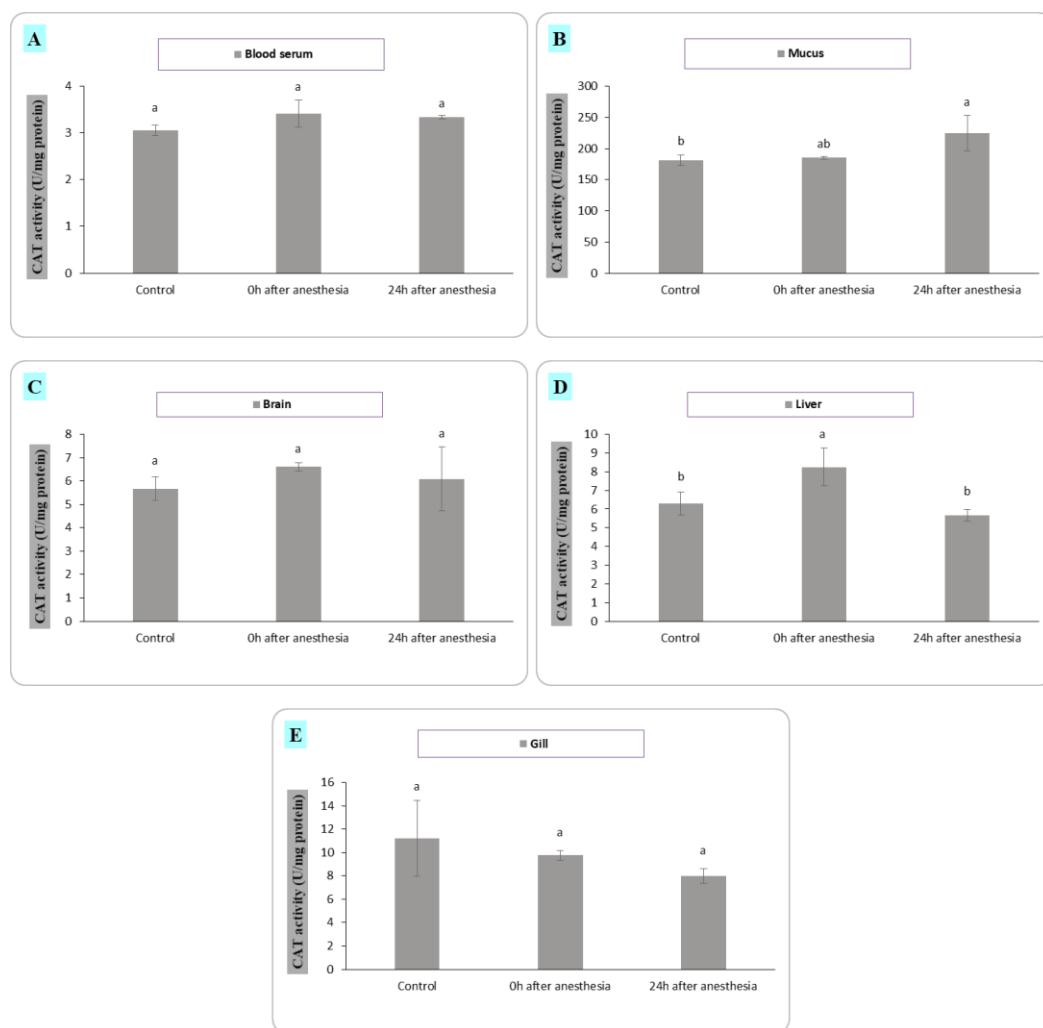
Figure 2: Superoxide dismutase (SOD) enzyme level changes in different tissues of anesthetized fish with 2-phenoxyethanol immediately and 24 hours after anesthesia

بیهوش کننده ۲-فتوکسی اتانول ($0/3$ میلی لیتر در لیتر) بلا فاصله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی با ماهیان گروه شاهد که بیهوشی در آنها اعمال نشده، در شکل

مقایسه فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در بافت‌های مختلف بدن (سرم خون، موکوس، مغز، کبد و آبشش) در ماهیان قزل آلای رنگین کمان بیهوش شده با حداقل دوز

کاتالاز ۲۴ ساعت پس از بیهوشی نسبت به گروه شاهد در تمامی بافت‌ها به جز موكوس روند کاهشی نشان داد؛ ولی این روند در موكوس به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه شاهد افزایشی بود. با مقایسه سطح آنزیم کاتالاز در بافت‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در هر سه تیمار (شاهد، بلافارسله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی)، بالاترین میزان آنزیم بر حسب واحد بین‌الملل بر میلی‌گرم پروتئین (U/mg protein) در موكوس ($224/97 \pm 28/64$) و پایین‌ترین سطح آن در سرم ($3/06 \pm 0/11$) می‌گردد (شکل ۳).

۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج نمایش داده در شکل ۳ که میزان فعالیت آنزیم CAT در بافت‌های مختلف را بر حسب واحد بین‌الملل بر میلی‌گرم پروتئین (U/mg protein) مقایسه می‌کند، این ماده بیهوشی در زمان صفر (بلافاصله پس از بیهوشی) سبب افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) در مقایسه با سطح آنزیم کاتالاز در بافت کبد (D) در مقایسه با ماهیان گروه شاهد شده است. ولی در این زمان سطح آنزیم کاتالاز در بافت‌های سرم (A)، موكوس (B)، مغز (C-۳) و آبشش (E) در مقایسه با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار نشان نداد ($p > 0.05$). سطح آنزیم

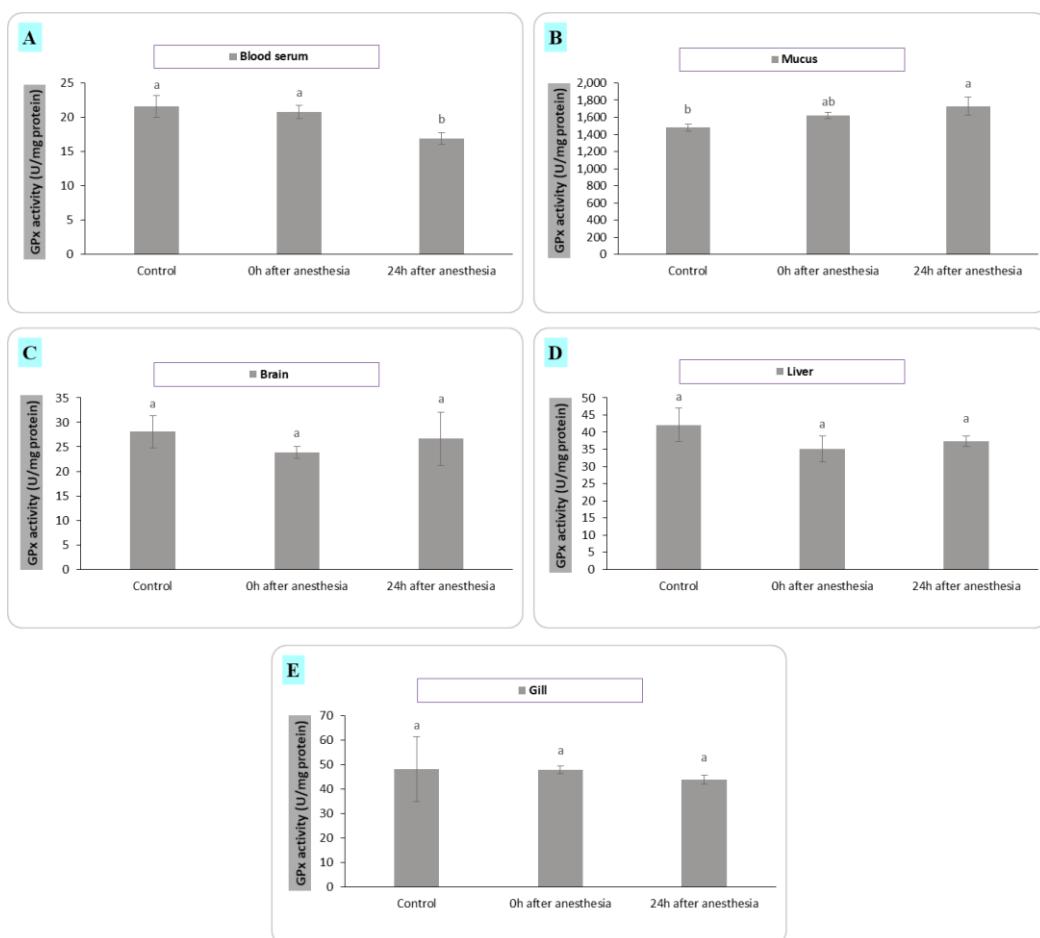


شکل ۳: تغییرات سطح آنزیم کاتالاز (CAT) در بافت‌های مختلف ماهیان بیهوشی شده با ۲-فنوکسی اتانول بلافارسله و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی

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

افزایش سطح این آنزیم در موکوس شده است ($p < 0.05$). سطح آنزیم GPx ۲۴ ساعت پس از بیهوشی در بافت موکوس افزایش معنی دار ($p < 0.05$) نسبت به گروه شاهد نشان داد، ولی سطح این آنزیم در سرم کاهش معنی دار ($p < 0.05$) نشان داد. با توجه به شکل ۴، مقایسه سطح آنزیم GPx در بافت های مختلف ماهی قزلآلای رنگین کمان نشان می دهد که در هر سه تیمار (شاهد، بلا فاصله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی) بالاترین میزان آنزیم GPx بر حسب واحد بین الملل بر میلی گرم پروتئین (U/mg protein) در موکوس $1020/59 \pm 1020/31 \pm 1730/31 \pm 1020/59$ و پایین ترین سطح آن در سرم خون $16/90 \pm 16/87$ مشاهده شدند ($p < 0.05$).

مقایسه فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) در بافت های مختلف بدن (سرم خون، موکوس، مغز، کبد و آبشن) در ماهیان قزلآلای رنگین کمان بیهوش شده با حداقل دوز بیهوش کننده ۲-فنوکسی اتانول بلا فاصله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی با ماهیان گروه شاهد در شکل ۴ که میزان فعالیت آنزیم GPx در بافت های مختلف را بر اساس واحد بین الملل بر میلی گرم پروتئین (U/mg protein) مقایسه می کند، بیهوشی با ۲-فنوکسی اتانول سبب کاهش سطح آنزیم GPx در زمان صفر (بلافاصله پس از بیهوشی) در سرم خون، مغز، کبد و آبشن در مقایسه با ماهیان گروه شاهد شده است و در مقابل



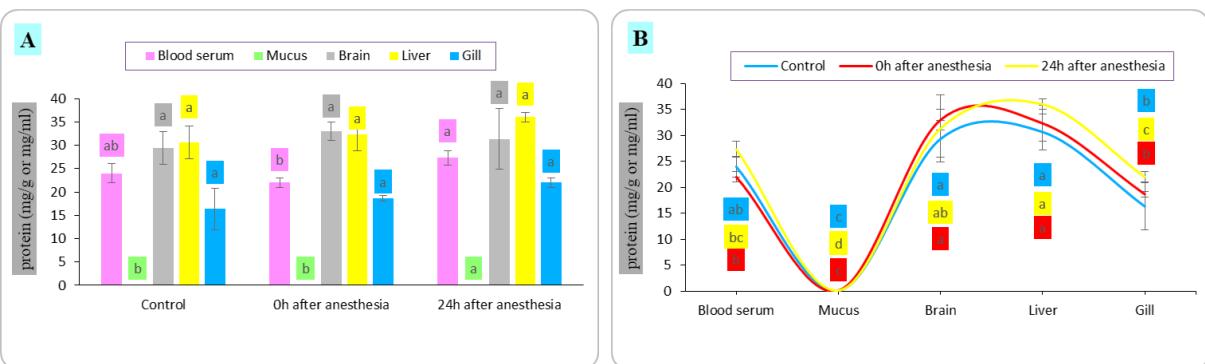
شکل ۴: تغییرات سطح آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) در بافت های مختلف ماهیان بیهوشی شده با ۲-فنوکسی اتانول بلا فاصله و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی

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

اثر ۲-فنوکسی اتانول بر ظرفیت آنژیم‌های ...

معنی داری بر میزان پروتئین در بافت‌های مختلف در مقایسه با ماهیان گروه شاهد ایجاد نکرد؛ تن‌ها در مورد بافت موکوس افزایش معنی دار ($p < 0.05$) سطح پروتئین را در فاصله ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی در مقایسه با گروه شاهد به همراه داشت. در شکل B-۵ مقایسه سطح پروتئین در بافت‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان می‌دهد که در هر سه تیمار (شاهد، بلافارسله بعد از بیهوشی و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی) بالاترین میزان پروتئین در بفت کبد که در هر سه تیمار (شاهد، بلافارسله بعد از بیهوشی و ۲۶/۰۰ \pm ۱/۰۰ ($p < 0.05$) و پایین‌ترین سطح در موکوس ساعت بعد از بیهوشی) مشاهده می‌گردد (شکل ۵).

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 بلافارسله 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 A که میزان فعالیت آنژیم 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



شکل ۵: تغییرات سطح پروتئین در بافت‌های مختلف ماهیان بیهوشی شده با ۲-فنوکسی اتانول بلافارسله 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 این که بر حسب نوع گونه، جنسیت، سن و اندازه ماهی عکس العمل آن در برابر یک داروی بیهوشی می‌تواند کاملاً متفاوت و غیرقابل پیش‌بینی 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)، دروغی 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 \pm ۱۴/۵۲ ثانیه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن ۵/۸۲ \pm 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 \pm ۸/۵۰ گونه‌های مختلف ماهیان با غلظت‌های مختلفی (۰/۶-۱/۲ میلی‌لیتر در لیتر) به منظور تسکین و القاء بیهوشی به کار 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 به کار 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 (۰/۱-۰/۲ میلی‌لیتر در لیتر) به منظور تسکین در مدت‌زمان‌های طولانی (نظیر عملیات حمل ماهیان) بهره Velisek گرفته می‌شود (Coyle *et al.*, 2004). در مطالعه Svobodava و مناسب ۲-فنوکسی اتانول برای بیهوشی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با متوسط وزن ۱۳/۲۵ گرم ۰/۳ میلی‌لیتر در

قزلآلای رنگین کمان ۳۰ دقیقه عنوان شده است و دفع دارو نیز عمدتاً از مسیر آبشن 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 آن-متیل-دی-آسپارتات (NMDA) میزان تحریک پذیری سلول‌های عصبی را با کمک کاهش آستانه تحریک پتانسیل عمل (از طریق گشودن کانال‌های یونی عامل نفوذ پیوندهای دارای بار مثبت نظری کلسیم، سدیم و پتاسیم) افزایش می‌دهد. از سوی دیگر، مهار گیرنده‌های مذکور در القاء بی‌حسی در ماهی نقش دارد (Grashoff *et al.*, 2006).

سوپر اکسید دی‌سوموتاز آنزیمی است که دی‌سوموتازیون 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 بی‌حسی در ماهیان، میزان فعالیت آنزیم SOD در آبشن، 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 تحت تأثیر رادیکال‌های آزاد تولیدی و استرس اکسیدانتیو ناشی از دارو بی‌حسی 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 بهطوری که 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 تحت تأثیر ماده بی‌حسی در مقایسه با گروه کنترل گزارش شده است. همچنین کاهش غیرمعنی‌دار سطح آنزیم در بافت آبشن در مطالعه مذکور گزارش شده که بعد از ۲۴ ساعت بهبود پیدا کرده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افت

لیتر تعیین شد. در مطالعه‌ای دیگر نیز محققین غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۴ میلی‌لیتر در لیتر ۲-فنوکسی اتانول را مناسب برای القاء بی‌حسی در ماهیان بالغ و غلظت ۰/۲۵ میلی‌لیتر در لیتر را مناسب برای بی‌حسی بجهة ماهیان قزلآلای Barton and Helfrich, (1981). Noga (1996) نیز غلظت ۰/۳-۰/۴ میلی‌لیتر در لیتر را برای القاء بی‌حسی در ماهیان توصیه کرده است که همگی با نتایج بدست‌آمده در مطالعه حاضر همسو هستند. اما در برخی مطالعات از غلظت‌های پایین‌تر ۲-فنوکسی اتانول (۰/۲ میلی‌لیتر در لیتر) برای بی‌حسی ماهیان قزلآلای رنگین کمان (با وزن ۱۸۰ گرم) استفاده شده است (Ucar and Atamanalp, 2010).

با قرارگیری ماهیان در حمام بی‌حسی حاوی ۲-فنوکسی اتانول، انتقال داروی بی‌حسی از مسیر پوست و آبشن‌ها 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 آبشن هر گونه ماهی برای ورود داروی بی‌حسی 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 آبشن در اختیار ماهی برای جذب داروی بی‌حسی قرار می‌دهد و تفاوت در میزان تکاملی که در سنین مختلف در این دو بافت در یک گونه و جنس مختلف اتفاق می‌افتد، از پیگیری مسیر ورود داروی بی‌حسی نیز ممکن می‌گردد. عوامل مذکور در کنار عواملی که تعیین‌کننده قدرت دفع و متابولیسم ماهی هستند، در مدت بی‌حسی 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 بی‌حسی 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

بررسی تغییرات سطح آنزیم GPx در ماهیان بیهوش شده نشان داد که در بافت مغز بلافصله 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 بلافصله بعد از بیهوشی رخ داده که بعد از ۲۴ ساعت سطح این آنزیم کمی افزایش یافته است. در مورد کبد نیز مانند مطالعه حاضر، افزایش سطح این آنزیم در کبد رخ داده، 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 آن جایی که 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 غیرتهراجمی (نمونه‌های موکوس یا خون) برای بیان وضعیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در مواجهه با داروی بیهوشی ۲-فنوکسی اتانول مناسب نیست.

تشکر و قدردانی

این طرح (با شماره طرح: ۱-۱۴۰۱-RIOZ-PR) با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری پژوهشگاه زابل انجام شده است.

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 آن جایی که 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 E، C و A، گلوتاتیون، اسیداوریک، GSH و لیپوئیک اسید)، موادمعدنی (روی، سلنیوم، مس، منگنز و آهن) و پروتئین‌های کلات کننده فلزی (فریتین، لاکتوفرین، آلبومین)، سروولوپلاسمین) 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 کم کند.

بررسی تغییرات آنزیم کاتالاز در بافت‌های مختلف ماهیان بیهوش شده نشان داد که سطح این آنزیم بلافصله بعد از بیهوشی در بافت‌های مغز و کبد به شکل معنی‌داری افزایش یافته، ولی ۲۴ ساعت پس از بیهوشی کاهش و به شرایط طبیعی نزدیک‌تر شده است. با توجه به این که آنزیم کاتالاز عمدها در پروکسی‌زوم‌ها قرار دارد و مستول کاهش هیدروژن پروکسید تولیدی از متابولیسم اسیدهای چرب بلند زنجیره در پروکسی‌زوم‌هاست که این آنزیم پیش‌تر به‌وسیله خط دفاعی قبلي (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 پیش‌تر 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.

منابع

- offish 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., Durbarow, R.M. and Tidwell, J.H., 2004.** Anesthetics in Aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center Publication no. 3900, 6 P.
- 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., Nilesen, 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*

- 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, *Oncorhynchus 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 caryophyllata*) 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 anaesthetics 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 anaesthetics. *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 Jojnsone, 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 Organisms*, 41: 43-51. Doi:10.3354/dao041043
- Salehi, H. and Khosravanzadeh, 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 (*Lota lota* 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 Aldeguende, 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 Svobodova, 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*)

Khosravanzadeh 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