فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۳، جلد ۱۱، شماره ۴، پائیز۹۷، صفحه ۳۷ تا ۴۸
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

بررسی بیهوش کنندگی غلظت‌های مختلف یوجینول در ماهیان انگشت قد و بالغ کلمه خزری(*Rutilus caspicus*)

محمد مازندرانی[۱]، ایمان مارزی[۲]، علی اکبر هدایتی[۳]، محمدرضا ایمانپور[۴]، ولی اله جعفری[۵]

۱-دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
mazandarani57@gmail.com
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
۳- دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
٤- استاد گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
۵- دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۲۵ تاریخ پذیرش:۹۷/۷/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی، در سال‌های اخیر استفاده از داروهای گیاهی و ترکیبات آن ها در ماهیان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در بررسی حاضر وضعیت بیهوش کنندگی یوجینول در ماهیان جوان و مولد کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) مورد مطالعه قرار گرفته است

روش کار: به این منظور تعداد ۱۲۰ عدد ماهی کلمه جوان با میانگین وزنی ۳/۱± ۱۰/٤ گرم و تعداد ۹۰ عدد ماهی کلمه مولد با میانگین وزنی ٤/٤± ٦۰/۵ گرم تهیه گردید. وضعیت بیهوشی و ریکاوری برای هر کدام از گروه‌های ماهیان کلمه انگشت‌قد و ماهیان مولد در غلظت‌های مختلف ۱۰، ۲۰، ٤۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر(ppm) بررسی شد. برای بررسی اثرات جانبی دارو، بافت‌شناسی کلیه و آبشش در ماهیانی که با ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر یوجینول بیهوش شدند صورت گرفت.

یافته‌ها: بر اساس نتایج یوجینول در غلظت‌های ٤۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم/ لیتر قادر به بیهوشی ماهیان مولد در کمتر از ۳ دقیقه می‌باشد، در حالی که ماهیان انگشت قد در رنج ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم/ لیتر یوجینول در کمتر از ۳ دقیقه بیهوش می‌شوند. در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه زمان بازگشت از بیهوشی در ماهیان انگشت قد و مولد کمتر از ۵ دقیقه ثبت گردید. در بافت شناسی آبشش ماهیان انگشت قدی که با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر یوجینول بیهوش شدند جداشدگی اپی تلیوم لاملاهای ثانویه تنها عارضه یافت شده بوده است، هم چنین هیچ عارضه بافتی نیز در کلیه ماهیان مورد بررسی مشاهده نگردید.

نتیجه گیری: بر اساس بررسی حاضر یوجینول می‌تواند به عنوان یک داروی بیهوشی ایمن در غلظت‌های ٤۰ تا ۱۰۰ ppm در ماهی کلمه خزری به کار گرفته شود.

واژه های کلیدی: یوجینول، بیهوشی، بافت‌شناسی کلیه و آبشش، *Rutilus caspicus*.

مقدمه

استفاده از داروهای بیهوش کننده در آبزی پروری در بسیاری موارد اجتناب ناپذیر است به عنوان مثال در شرایطی هم چون معاینات دوره‌ای، بیومتری‌ها، حمل و نقل ماهیان بزرگ، خون‌گیری، تکثیر مصنوعی و جراحی‌ها بدون کمک گرفتن از داروهای آرام بخش با مشکلات فراوانی روبرو خواهیم شد(۲۵، ۱۱). در تمامی این موارد هدف از به کارگیری این ترکیبات کاهش آسیب و استرس به ماهیان و نیز سهولت کار می باشد. امروزه از داروهای متعددی برای بیهوشی ماهیان استفاده می‌شود که در این راستا می توان به داروهایی هم چون متومیدات(Metomiadate)، فنوکسی اتانول، AQUI-S (ماده سنتتیک ایزو یوجینول)، بنزوکایین(Benzocaine)،

تری‌کایین متان سولفانات(MS222)، و عصاره میخک اشاره نمود(۱۲، ۱۰). در این راستا غلظت داروهای بیهوش کننده و مرحله بیهوشی برای ترکیبات دارویی مختلف بسیار متفاوت است در عین حال حساسیت ماهیان نسبت به مواد بیهوش کننده نیز بسته به گونه ماهی و حتی نیز سایز ماهی متفاوت گزارش شده است(۲۲). به همین دلیل دانستن وضعیت بیهوش کنندگی داروها برای هر گونه ماهی در اوزان مختلف و نیز اطلاع از عوارض جانبی احتمالی هر دارو برای ماهیان مورد استفاده بسیار ضروری و مفید است.

یوجینول نیز یکی از ترکیبات بیهوش کننده رایج در آبزیان بوده که در ماهیان مختلف مورد بررسی قرار گرفته است این ماده عمده‌ترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس میخک به حساب می‌آید، به عبارت دیگر اسانس میخک عمدتاً از ساقه، برگ و گل گیاه میخک(*Eugenia aromatica*) تهیه می‌شود که یوجینول به عنوان ماده موثره آن شناخته شده و ۹۰ تا ۹۵ درصد ترکیب آن‌را تشکیل می‌دهد(۱۳، ۵). از آن جایی که ترکیب مذکور از منبع گیاهی استخراج شده است و در عین حال برای مصرف کنندگان انسانی منع مصرف ندارد، در بررسی‌های متعدد به عنوان یک بیهوش کننده قابل قبول برای ماهیان مختلف پیشنهاد شده است که در این راستا می توان به بررسی بیهوش کنندگی این ماده در کپور معمولی(*Cyprinus carpio*)(۹)، ماهی سیامی جنگجو(*Betta splendens*)(۱۹)، ماهی پست *Barbus grypus*(۱۷)، لاروهای میگوی سفید هندی(*Fenneropenaeus indicus*)(۳) و مارماهی اروپایی(*Anguilla Anguilla*)(۴) اشاره نمود. با توجه به بررسی‌های یاد شده دوز بیهوش کنندگی یوجینول برای ماهیان مختلف متفاوت گزارش شده است لذا نمی‌توان بدون بررسی غلظت مشخصی را برای ماهیانی که اثر بیهوش کنندگی این ماده در آن ها بررسی نشده است پیشنهاد نمود.

بررسی‌های بافتی یکی از راه‌های بسیار مناسب برای شناسایی اثرات جانبی داروها است، زیرا مسمومیت دارویی تا زمانی که یک دارو در بدن با آستانه سمی نرسد فاقد علایم بالینی است و تشخیص آسیب‌های احتمالی تنها از طریق بررسی‌های پاراکلینیکی امکان‌پذیر بوده و در این راستا، بررسی آسیب‌های بافتی یکی از بهترین روش‌های تشخیصی محسوب می‌شود(۸). در رابطه با بررسی آسیب‌های بافتی ناشی از به‌کار گیری داروهای بی‌هوشی در آبزیان مطالعات محدودی صورت گرفته است که عمدتاً با بافت شناسی کلیه، آبشش پرداخته‌اند و در مجموع عمده عوارض بافتی برای داروهای قابل قبول در بیهوشی آبزیان ادم مختصر لاملاهای ثانویه در آبشش بوده است(۲۴، ۲۳، ۱۸، ۵).

ماهی کلمه خزری(*Rutilus caspicus*) از جمله ماهیان با ارزش دریای خزر است که متاسفانه در سال‌های اخیر به طور چشمگیری جمعیت این گونه با ارزش در دریای خزر کاهش یافته است، لذا در راستای بازسازی ذخایر این ماهیان با ارزش همه ساله سازمان شیلات کشور اقدام به تکثیر مصنوعی این ماهی و پرورش بچه ماهیان تا مرحله انگشت قد و نهایتاً رها سازی به دریا می-نماید(۲). در این راستا نگهداری آماده سازی و انجام عملیات تکثیر مصنوعی برای مولدین این ماهی با استرس بالایی همراه است، از طرف دیگر حمل و نقل و رهاسازی بچه ماهیان در دریا نیز همواره منجر به استرس بسیار بالا می‌شود که می‌تواند بر بازدهی و کارایی عملیات بازسازی تاثیر گذار باشد، یکی از راه های کاهش این استرس استفاده از داروهای آرام‌بخش و بیهوش کننده‌ها است(۱۲، ۳). با توجه به این امر که هیچ اطلاعاتی در رابطه با وضعیت بیهوش کنندگی یوجینول در ماهی کلمه خزری در دست نبوده در بررسی حاضر

حساسیت و وضعیت بیهوشی این ماهیان در دو گروه وزنی ماهیان انگشت قد و ماهیان بالغ در غلظت‌های مختلف یوجینول مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. در عین حال به منظور بررسی عوارض جانبی یوجینول در کلمه خزری بافت‌های کلیه و آبشش در این ماهیان مورد بررسی‌های بافت‌شناسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

تهیه ماهی و آداپتاسیون

به منظور انجام بررسی حاضر تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کلمه خزری(*Rutilus caspicus*) انگشت قد با میانگین وزنی ۳/۱± ۱۰/۴ گرم و هم چنین ۹۰ قطعه ماهی مولد با میانگین وزن۴/۴± ۶۰/۵ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی سیجوال(استان گلستان) تهیه، آماده و مورد آزمایش قرار گرفتند. ماهیان توسط پلاستیک حمل ماهی به آزمایشگاه منتقل شده، پس از هم‌دما سازی به دو تانک فایبرگلاس با حجم آب ۴۰۰ لیتر و با ابعاد ۱×۱ متر مربع و ارتفاع آبگیری ۴۰ سانتی‌متر منتقل گردیدند. ماهیان به مدت ۳ هفته جهت آداپتاسیون در محیط و نیرو پرورش و در طی این مدت به میزان ۳٪ وزن بدن با غذای تجاری به صورت روزانه غذادهی شدند. هوادهی به صورت شبانه و روزی بوده و دمای آب در طی مدت نگهداری ۱±۲۰ درجه سانتی گراد ثبت گردید. در طی دوره ۷۰٪ آب هر ونیرو به صورت روزانه تعویض شد.

آماده سازی ماده بیهوش‌کننده یوجینول و طرح آزمایش

در این مطالعه یوجینول ماده موثره(عمده ترکیب) اسانس میخک با ماده غلظت ۹۹٪ از شرکت سیگما(Sigma_ Alderich Co.) تهیه گردید.

پس از اندازه‌گیری پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب از جمله دما در یک بررسی پیش_ تست تعدادی از ماهیان در غلظت های مختلف قرار داده شده تا وضعیت بیهوش کنندگی این ترکیب دارویی در ماهیان مورد مطالعه به دست بیاید سپس با توجه به این یافته، به منظور بررسی دقیق وضعیت بیهوش‌کنندگی این ماده برای هر کدام از گروه‌های ماهیان کلمه انگشت‌قد و ماهیان مولد پنج گروه تیمار با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی-گرم درلیتر(ppm) در نظر گرفته شده و وضعیت بیهوشی و ریکاوری آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت(۲۳، ۱۸). غلظت یوجینول پس از محاسبه دقیق در ۱ سی‌سی الکل اتانل ۹۶٪ حل شده و مورد استفاده قرار گرفت(۱۸)، به همین دلیل برای هر کدام از گروه‌ها مولد و انگشت قد یک گروه شاهد حاوی حلال نیز در نظر گرفته شد تا اثرات حلال نیز در این بررسی مد نظر گرفته شده باشد. ظرف‌های بیهوشی برای هر کدام از تیمارها حاوی ۱۰ لیتر آب بوده و ماهیان هر تیمار به صورت جداگانه به منظور ثبت مراحل مختلف بیهوشی در این تشت‌ها قرار داده و مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور بررسی وضعیت ریکاروی، ماهیان پس از بیهوشی، ماهیان به یک و نیرو جداگانه حاوی ۲۵۰ لیتر آب(با هوادهی) منتقل شده و مراحل مختلف و واکنش‌های رفتاری آن‌ها ثبت گردید، به این منظور، برای تعیین مراحل مختلف بیهوشی و ریکاوری بر اساس روش Altun و همکاران(۲۰۰۶) استفاده گردیده و ۵ مرحله برای هر کدام تعیین شد(۴). به منظور ثبت دقیق مراحل بیهوشی و ریکاوری مراحل یاد شده توسط دوربین ثبت شده و به دقت مورد مطالعه قرار گرفتند. در این بررسی برای ماهیان انگشت قد برای هر تیمار ۲۰ ماهی مورد بررسی قرار گرفتند و هم چنین برای ماهیان مولد نیز برای هر تیمار ۱۵ ماهی بررسی شد.

بررسی‌های بافت شناسی

به منظور بررسی آسیب شناسی بافتی احتمالی به دلیل محدودیت‌های مالی، بررسی فقط در ماهیان جوانی که با بالاترین غلظت بی‌هوش شدند(۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر) صورت گرفت. در این راستا نمونه‌برداری‌ها از بافت‌های کلیه وآبشش بلافاصله پس از بی‌هوشی صورت گرفت(از هر تکرار ۲ نمونه ماهی و در مجموع از ۶ ماهی

نمونه‌برداری انجام شد). نمونه‌برداری از آبشش از دومین کمان آبششی، نمونه‌های کلیوی از کلیه میانی صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله در فرمالین ۱۰٪ فیکس شده و پس از ۱۲ ساعت فیکساتیو نمونه‌ها تعویض شده و به آزمایشگاه ارسال گردید. در آزمایشگاه آماده سازی بافت‌های نمونه برداری شده با کمک دستگاه پروسسور بافتی صورت گرفته و بر اساس روش‌های متداول بافت-شناسی مقاطع ۵ میکرونی از نمونه‌های بافتی تهیه گردیده و به روش هماتوکسیلین _ ائوزین رنگ آمیزی شد(۲۰). بررسی آسیب‌های بافتی مقاطع با میکرسکوپ نوری (Nikon) در بزرگنمایی ۱۰۰ تا ۴۰۰ برابر صورت گرفت.

بررسی‌های آماری

در پایان نتایج بررسی حاضر در نرم افزار Execel دسته بندی شده و نتایج به صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان گردید. جهت مقایسه میانگین‌ها از نرم افزار SPSS18 و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه Anova و تست دانکن در سطح سطح اطمینان ۹۵ درصد($P <$ ۰/۰۵) استفاده گردید.

نتایج

نتایج مراحل مختلف بیهوشی و ریکاوری ماهیان جوان و مولد کلمه خزری در جداول ۱ تا ۴ قابل مشاهده است. بر اساس این نتایج تمامی غلظت های ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر قادر القای بیهوشی در ماهیان جوان کلمه خزری هستند بر اساس همین نتایج غلظت‌های ۴۰ تا ۸۰ میلی‌گرم/لیتر قادر به ایجاد بی‌هوشی در ماهیان جوان کلمه خزری در زمان کمتر از ۳ دقیقه بوده و این در حالی است که مدت زمان القای بیهوشی در غلظت‌های ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر حدود یک دقیقه برای این ماهیان ارزیابی گردید، تمامی مراحل مختلف بیهوشی با افزایش غلظت دارو به‌طور معنی‌داری کاهش یافت(جدول ۱). مدت زمان بازگشت از بی‌هوشی برای تمامی غلظت‌های مورد مطالعه در ماهیان جوان کلمه خزری کمتر از ۵ دقیقه ثبت گردید که بر اساس بررسی-های آماری با افزایش غلظت دارو مدت زمان بازگشت از بیهوشی به‌طور معنی‌داری افزایش داشت(جدول ۲). در بررسی ماهیان مولد غلظت ۱۰ میلی‌گرم/لیتر قادر به القای کامل بیهوشی در طی ۱۰ دقیقه نگردید، در این بررسی ماهیان مولدی که با غلظت ۲۰ میلی‌گرم/لیتر دارو مورد مواجهه قرار گرفتند پس از حدود ۴ دقیقه به مرحله ۵ بیهوشی وارد شدند و این درحالی است که ماهیانی که در غظلت‌های ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم/لیتر یوجینول قرار گرفتند در حدود ۳ دقیقه و ماهیانی که در معرض غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر بودند در کمتر از ۲ دقیقه به مرحله ۵ بیهوشی(بیهوشی کامل) رسیدند(جدول ۳). در این بررسی در زمان رسیدن به مراحل ۲ تا ۴ بیهوشی برای غلظت‌های ۴۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر اختلاف معنی‌دار ثبت نگردید اما این اختلاف زمانی در برای رسیدن به بیهوشی کامل معنی‌دار بود($P <$ ۰/۰۵). در بررسی زمان بازگشت از بیهوشی در ماهیان مولد اختلاف معنی‌داری برای غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم/لیتر ثبت نگردید($P >$ ۰/۰۵)، اما این مدت برای ماهیانی که با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر بیهوش شده بودند به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر غلظت‌ها بود(جدول ۴). هم‌چنین بر اساس بررسی‌های آماری در برای تمامی غلظت‌های ۲۰ مورد تا ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر زمان رسیدن به بیهوشی کامل برای ماهیان جوان به‌طور معنی‌داری در مقایسه با ماهیان مولد کلمه خزری بالاتر ثبت گردید(نمودار ۱)، اما در زمان بازگشت از بی‌هوشی اختلاف معنی‌داری بین ماهیان جوان و ماهیان مولد مشاهده نگردید(نمودار۱). در بررسی‌های بافت شناسی بی‌هوشی با غلظت ۱۰۰ میلی-گرم/لیتر در ماهیان جوان هیچ عارضه‌ای در بافت های کلیه و ایجاد نکرد، اما در بررسی بافتی مقاطع آبشش ادم و جداشدگی مختصر اپی تلیوم لاملاهای ثانویه عمده-ترین عارضه قابل مشاهده بود (شکل ۱).

جدول۱- زمان مراحل مختلف بیهوشی ماهیان انگشت قد کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) در معرض غلظت‌های مختلف یوجینول (میلی‌گرم/لیتر)

زمان مراحل بیهوشی ثانیه	تیمار۱ (۱۰ppm)	تیمار۲ (۲۰ppm)	تیمار۳ (۴۰ppm)	تیمار۴ (۸۰ppm)	تیمار۵ (۱۰۰ppm)
مرحله ۱ ثانیه	۶۷/۹۰±۷/۱۷^{a}	۶۰/۲۰±۱۴/۵^{b}	۳۹/۱۰±۶/۴۵^{c}	۳۲/۰۰±۳/۳۶ ^{Cd}	۲۷/۴۰±۶/۶۵^{d}
مرحله۲ ثانیه	۷۴/۹۰±۸/۹۱^{a}	۷۴/۹۰±۱۶/۹۲^{a}	۴۲/۷۰±۶/۶۸^{b}	۴۰/۰۰±۴/۰۲^{bc}	۳۲/۷۰±۸/۹۸ ^{c}
مرحله۳ ثانیه	۸۶/۵۰±۳/۴۰^{a}	۸۵/۱۰±۱۷/۴۷^{a}	۴۸/۶۰±۷/۲۲^{b}	۴۸/۰۰±۷/۵۵^{b}	۳۵/۷۰±۹/۰۸^{c}
مرحله٤ ثانیه	۹۹/۷۰±۴/۳۷^{a}	۹۸/۱۰±۲۰/۵۲^{a}	۵۵/۰۰±۷/۸۱^{b}	۵۴/۹۰±۱۱/۳۴^{b}	۳۹/۸۰±۹/۳۷^{c}
مرحله ۵ ثانیه	۱۷۶±۳۸/۸۳^{a}	۱۶۲±۱۵/۴۳^{a}	۷۹/۰۰±۱۹/۸۱^{b}	۶۳/۲۰±۱۲/۵۰^{bc}	۴۶/۶۰±۱۱/۰۹^{c}

وجود حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده معنی‌دار بودن اختلافات در پارامترهای مذکور می‌باشد($P\leq$۰/۰۵). داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار می‌باشد.

جدول۲- زمان مراحل مختلف بازگشت از بیهوشی(ریکاوری) ماهیان انگشت قد کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) در معرض غلظت‌های مختلف یوجینول(میلی‌گرم/لیتر)

مراحل ریکاوری	تیمار۱ (۱۰ppm)	تیمار۲ (۲۰ppm)	تیمار۳ (۴۰ppm)	تیمار۴ (۸۰ppm)	تیمار۵ (۱۰۰ppm)
مرحله ۱ ثانیه	۴۴/۹۰±۱۳/۹۷^{b}	۴۶/۴۰±۸/۲۰ ^{b}	۸۸/۳۳±۲۲/۱۵ ^{a}	۱۰۲±۲۷/۱۵ ^{a}	۱۰۷±۲۷/۵۰ ^{a}
مرحله۲ ثانیه	۷۶/۳۰±۲۵/۸۴^{c}	۹۰/۲۰±۲۷/۶۰^{ab}	۱۲۰±۳۶/۰۱^{ab}	۱۴۱±۲۱/۱۰^{a}	۱۴۲±۲۱/۲۵^{a}
مرحله۳ ثانیه	۹۹/۹۰±۲۳/۷۶^{b}	۱۰۹±۳۶/۶۲^{b}	۱۶۲±۳۶/۲۷^{a}	۱۶۸±۲۷/۱۹^{a}	۱۷۹±۳۱/۳۰^{a}
مرحله٤ ثانیه	۱۲۱±۲۲/۸۲^{b}	۱۵۰±۵۰/۳۰^{b}	۲۱۱±۳۲/۹۶^{a}	۲۲۸±۴۰/۷۹^{a}	۲۳۲±۲۹/۵۸^{a}
مرحله ۵ ثانیه	۲۲۵±۸۲/۶۸^{c}	۲۳۶±۵۸/۵۰^{bc}	۲۷۵±۳۷/۹۸^{bc}	۲۹۱±۴۲/۸۷^{ab}	۳۳۳±۶۰/۹۰^{a}

وجود حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلافات در پارامترهای مذکور می‌باشد($P\leq$۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار می‌باشد.

جدول۳- زمان مراحل مختلف بیهوشی ماهیان مولد کلمه خزری(*Rutilus caspicus*) در معرض غلظت‌های مختلف یوجینول(میلی‌گرم/لیتر)

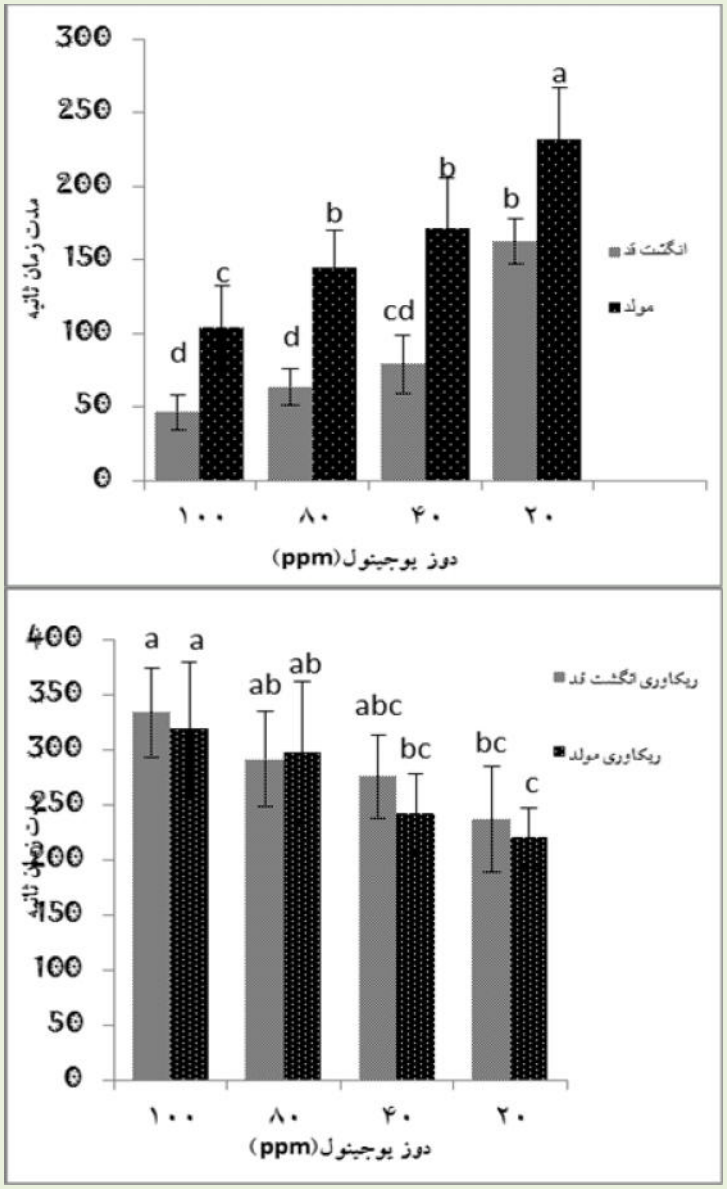
زمان مراحل بیهوشی (ثانیه)	تیمار۱ (۱۰ppm)	تیمار۲ (۲۰ppm)	تیمار۳ (۴۰ppm)	تیمار۴ (۸۰ppm)	تیمار۵ (۱۰۰ppm)
مرحله ۱ ثانیه	بیهوشی انجام نشد	۴۹/۱۴±۵/۷۸^{a}	۴۱/۴۲±۸/۶۹^{b}	۳۳/۴۲±۶/۳۲^{c}	۳۰/۱۴±۴/۸۴^{c}
مرحله۲ ثانیه	بیهوشی انجام نشد	۶۸/۷۱±۱۴/۹۷^{a}	۴۶/۴۲±۸/۲۸^{b}	۴۰/۵۷±۹/۲۸^{b}	۳۹/۴۲±۱۰/۲۱^{b}
مرحله۳ ثانیه	بیهوشی انجام نشد	۸۴/۷۱±۱۸/۷۵^{a}	۵۳/۳۸±۶/۶۷^{b}	۴۷/۱۴±۱۰/۹۱^{b}	۴۸/۰۰±۱۴/۷۴^{b}
مرحله٤ ثانیه	بیهوشی انجام نشد	۱۵۱±۴۱/۰۸^{a}	۶۲/۴۲±۲/۵۷^{b}	۵۳/۷۱±۱۴/۰۳^{b}	۵۵/۰۰±۲۱/۰۵^{b}
مرحله ۵ ثانیه	بیهوشی انجام نشد	۲۳۸±۴۸/۵۷^{a}	۱۷۱±۹۱/۰۳^{b}	۱۴۴/۲۸±۱۱/۶۱^{bc}	۱۰۳±۳۷/۹۷^{c}

وجود حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلافات در پارامترهای مذکور می‌باشد($P\leq$۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگی±انحراف معیار می‌باشد.

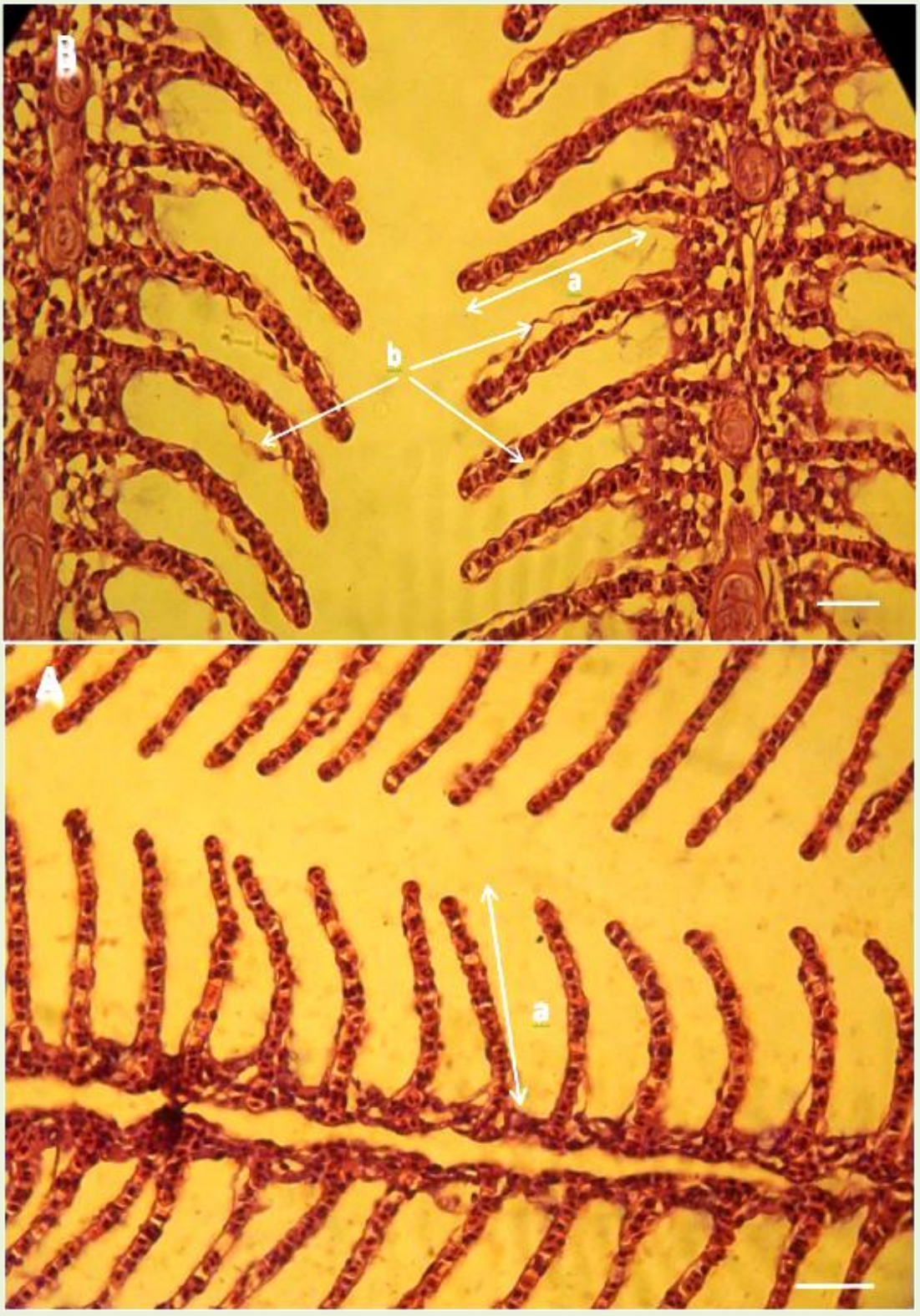
جدول٤- زمان مراحل مختلف بازگشت از بی‌هوشی (ریکاوری) ماهیان مولد کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) در معرض غلظت‌های مختلف یوجینول (میلی‌گرم/لیتر)

مراحل ریکاوری	تیمار۱ (۱۰ppm)	تیمار۲ (۲۰ppm)	تیمار۳ (٤٠ppm)	تیمار٤ (۸۰ppm)	تیمار٥ (۱۰۰ppm)
مرحله ۱ ثانیه	بیهوشی انجام نشد	۵۵/۰۰±۱۴/۲۱^{a}	۶۹/۷۱±۳۷/۰۳^{a}	۷۰/۰۰±۲۶/۱۹^{a}	۷۱/۱۶±۱۲/۳۸^{a}
مرحله۲ ثانیه	بیهوشی انجام نشد	۷۳/۵۰±۹/۳۹^{b}	۹۳/۲۸±۳۱/۷۰^{b}	۱۰۴±۳۹/۷۵^{b}	۱۴۵±۴۵/۹۲^{a}
مرحله۳ ثانیه	بیهوشی انجام نشد	۱۰۶±۲۲/۰۴^{b}	۱۱۴±۲۹/۵۵^{b}	۱۲۹±۳۸/۰۴^{ab}	۱۶۹±۴۸/۸۶^{a}
مرحله٤ ثانیه	بیهوشی انجام نشد	۱۶۱±۱۶/۳۵^{b}	۱۶۶±۲۳/۱۹^{b}	۱۶۹±۲۸/۶۸^{b}	۲۳۴±۵۹/۷۷^{a}
مرحله ٥ ثانیه	بیهوشی انجام نشد	۲۱۹±۲۷/۵۰^{b}	۲۴۲±۳۵/۸۳^{ab}	۲۹۷±۷۰/۸۱^{ab}	۳۲۰±۶۰/۶۴^{a}

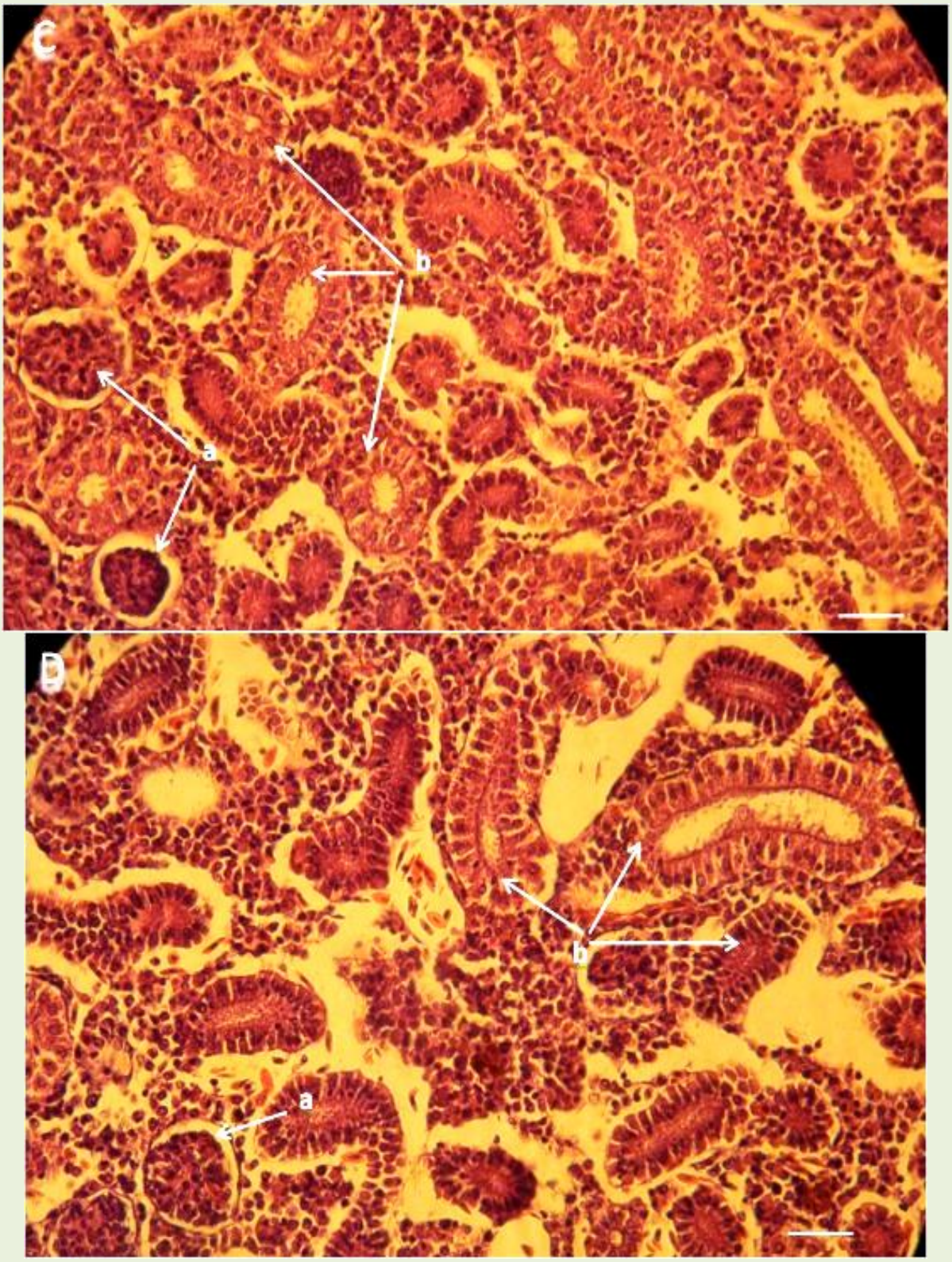
وجود حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلافات در پارامترهای مذکور می‌باشد($P\leq$۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار می‌باشد.



نمودار ۱-مقایسه متوسط مدت زمان بیهوشی نهایی (نمودار بالا) و زمان بازگشت از بیهوشی (نمودار پائین) در غلظت‌های مختلف ماده بیهوشی یوجینول در ماهیان انگشت و مولدین کلمه خزری



شکل ۱-بررسی آسیب شناسی بافتی ماهیان بیهوش شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/ لیتر یوجینول به روش حمام دارو (A): بافت آبشش گروه کنترل بدون بیهوشی: بافت سالم لاملاهای ثانویه (a)، (B) : بافت آبشش در ماهیان پس از بیهوشی: لاملای ثانویه (a)، جداشدگی مختصر اپی تلیوم پوششی لاملاهای ثانویه (b)، رنگ آمیزی H & E (بزرگنمایی × ٤٠٠).



شکل ۱- بررسی آسیب شناسی بافتی ماهیان بیهوش شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/ لیتر یوجینول به روش حمام دارو (C): بافت کلیه در ماهیان گروه کنترل بدون بیهوشی: گلومرول کلیوی طبیعی (a)، توبول‌های کلیوی طبیعی (b)، (D): بافت کلیه در ماهیان بیهوش شده با یوجینول: گلومرول کلیوی طبیعی (a)، توبول‌های کلیوی طبیعی (b) رنگ آمیزی H & E (بزرگنمایی × ٤٠٠).

بحث ونتیجه گیری

همان‌گونه که عنوان گردید در بسیاری موارد استفاده از داروهای بیهوش کننده در آبزیان اجتناب‌ناپذیر است، به همین دلیل انتخاب یک داروی بیهوشی مناسب از اهمیت بالایی برخوردار است. بر اساس نظر برخی محققین یک داروی بیهوشی مناسب دارویی است که قادر باشد در زمان کمتر از ۳ دقیقه در ماهی ایجاد بیهوشی کرده، هم چنین زمان بازگشت از بیهوشی آن نیز کمتر از ۵ دقیقه باشد در عین حال با کم‌ترین عوارض جانبی همراه باشد(۱۴، ۱۱). بر اساس بررسی‌های متعدد یک داروی بیهوشی چنان چه در غلظت مناسب استفاده شود منجر به کاهش صدمات فیزیکی(به‌خصوص در خلال حمل و نقل و یا نمونه‌برداری‌ها وغیره)، کاهش مصرف اکسیژن و در مجموع کاهش استرس می‌گردد، اما همین دارو چنان چه در غلظت نامناسب به‌کار گرفته شود قادر خواهد بود استرس بالایی به ماهی وارد نموده و حتی به مرگ ماهی ختم شود(۱۲). در عین حال غلظت مناسب یک بیهوش کننده تحت تاثیر عوامل مختلف فیزیکوشیمیایی ممکن است تغییر کند به عنوان مثال در دمای بالاتر میزان اثر اکثر داروهای بیهوشی افزایش می‌یابد لذا حتی ممکن است یک داروی مناسب در رنج غلظت پیشنهاد شده، با افزایش دمای آب منجر به بیهوشی بیش از حد و مرگ ماهی شود(۱۶). براساس این دلایل غلظت مناسب برای هر دارو باید با توجه به شرایط فیزیکوشیمیایی، گونه ماهی و حتی اندازه و سایز ماهی تعیین گردد. بر اساس نتایج بررسی حاضر چنان چه زمان بیهوشی و ریکاوری مناسب به ترتیب ۳ و ۵ دقیقه در نظر گرفته شود در ماهیان کلمه خزری جوان در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم/لیتر یوجینول قادر به ایجاد بی‌هوشی مناسب در ماهیان جوان در حدود ۳ دقیقه هستند زمان القای بی‌هوشی در غلظت‌های ۴۰ تا ۸۰ میلی‌گرم/لیتر حدود یک دقیقه و برای غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر کمتر از ۱ دقیقه ثبت گردید. در عین حال برای تمامی غلظت‌ها به جز غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر زمان بازگشت از بیهوشی کمتر از ۵ دقیقه ثبت شد. در ماهیان مولد غلظت بیهوش کنندگی یوجینول از ۲۰ میلی‌گرم/لیتر آغاز گردید اما در غلظت‌های ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم/لیتر القای بیهوشی در زمان کمتر از ۳ دقیقه اتفاق افتاد و این درحالی است که القای بیهوشی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر در زمان کمتر از ۲ دقیقه اتفاق افتاد. زمان بازگشت از بیهوشی در تمامی غلظت‌های به کار گرفته شده کمتر از ۵ دقیقه ثبت شد. بنابراین بسته به شرایط و سایز ماهی غلظت ۴۰ تا ۸۰ میلی‌گرم/لیتر برای یک بی‌هوشی قابل قبول و همراه با کمترین عوارض جانبی در ماهی کلمه خزری پیشنهاد می‌شود اما چنان چه بیهوشی بسیار سریع مد نظر باشد می‌توان از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر یوجینول نیز با کم‌ترین عوارض جانبی در ماهی کلمه خزری از سایز انگشت قد تا مولدین استفاده نمود. یوجینول به عنوان ماده موثره روغن میخک یکی از داروهایی است که به طور گسترده برای بیهوشی در ماهیان مختلف به کار گرفته می‌شود اما غلظت بیهوش کنندگی این ماده در ماهیان مختلف متفاوت گزارش شده است، بسته به سایز و گونه ماهی غلظت بیهوش کنندگی یوجینول بین ۹ تا ۲۰۰ میلی‌گرم/لیتر گزارش شده است(۱۶). غلظت به کار گرفته در بی‌هوشی میگوها و سخت پوستان بالاتر از این مقادیر نیز گزارش شده است به عنوان مثال در یک مطالعه مقادیر بیهوش کننده برای میگوی *Macrobrachium rosenbergii* بین ۱۰۰ تا ۸۰۰ میلی‌گرم/لیتر گزارش گردید(۲۱). در بررسی حسینی و قلیچ‌پور(۱۳۹۱) غلظتی که در کمتر از ۳ دقیقه در ماهی قرمز(*Carassius auratus*) ایجاد بیهوشی کند بین ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم/لیتر ثبت گردید(۱). Martins و همکاران(۲۰۱۴) غلظت مناسب یوجینول برای بیهوشی

ماهی *Piaractus brachypomus* را در ۵۰ تا ۷۵ میلی-گرم/لیتر عنوان نمودند در این بررسی ۱۰۰ ٪ ماهیانی که با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم/لیتر بیهوش شده بودند تلف گردیدند(۱۵). Diemer و همکاران(۲۰۱۲) غلظت مناسب برای بیهوشی گربه ماهی نقره‌ای(*Rhamdia voulezi*) را ۵۰ میلی‌گرم/لیتر گزارش نمودند(۷). در بررسی دیگری غلظت میانه کشنده(LC50) یوجینول برای پست لاروهای میگوی سفید هندی در طی ۲۴ ساعت ۵/۳ میلی‌گرم/لیتر محاسبه گردید هم چنین غلظت پیشنهادی برای کاهش استرس حمل و نقل این پست لاروها ۱/۳ میلی‌گرم/لیتر عنوان گردید(۳). با بررسی‌های بافتی در بسیاری موارد می‌توان آسیب‌های پاراکلینیکی که در ظاهر قابل مشاهده نیست را جستجو نمود لذا می-توان با استفاده از این روش آسیب‌های وارده ناشی از به-کارگیری داروهای بیهوشی را در آبزیان بهتر بررسی نمود. در رابطه با آسیب‌های بافتی ناشی از استفاده از داروهای بیهوش کننده در ماهیان بررسی‌های زیادی صورت نگرفته است. در بررسی Velisek و همکاران(۲۰۰۵) استفاده از اسانس گل میخک به عنوان بیهوش کننده هیچ آسیب بافتی در بافت‌های کبد، کلیه، طحال و پوست ماهی کپور معمولی ایجاد ننمود و تنها عرضه ثبت شده جدا شدگی مختصر اپی تلیوم پوششی لاملاهای ثانویه در آبشش ماهیان بود که پس از ۲۴ ساعت ترمیم گردید(۲۳). نتایج مشابهی در بیهوشی گربه ماهی ولز(*Silurus glanis*) با ۲-فنوکسی‌اتانول و هم چنین بیهوشی روغن میخک در ماهی *Haludaria fasciata* گزارش گردید(۲۴، ۱۸). در بررسی دیگری عارضه بافتی ثبت شده در ماهیان *Colossoma macropomum* بیهوش شده با ۵۰ میلی‌گرم/لیتر یوجینول، جداشدگی اپی تلیوم پوششی لاملاهای ثانویه بوده است(۵). بر اساس سالنامه آماری شیلات ایران روند صید ماهیان کلمه خزری در طی دهه گذشته به‌طور تاسف‌باری کاهش یافته است و این امر به گونه‌ای است که در بحث بازسازی ذخایر دریا حتی تهیه مولدین این ماهی نیز با مشکلاتی همراه است به همین دلیل در برخی مراکز بازسازی ذخایر، بحث پرورش و مولد سازی این ماهی باید مورد توجه بیشتر قرار گیرد(۲). از طرفی یکی از راه های رایج کاهش استرس این ماهیان در زمان حمل و نقل و رها سازی به دریا و هم چنین تکثیر مصنوعی و زنده نگه‌داشتن مولدین پس از تخم کشی، استفاده از داروهای آرام‌بخش و بیهوش کننده از جمله یوجینول است. با توجه به بررسی‌های بافت شناسی بررسی حاضر حتی غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر یوجینول نیز عوارض بافتی زیادی برای ماهی به همراه ندارد لذا می‌توان در رنج های یاد شده با رعایت اصول بهداشتی در ماهی کلمه خزری مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

۱-حسینی، س.م.، قلیچ پور، م. ۱۳۹۱. اثر غلظت های مختلف یوجینول و زمان بیهوشی بر برخی شاخص های بیوشیمیایی خون ماهی قرمز *Carassius auratus*). مجله پژوهش های ماهی شناسی کاربردی. سال اول. شماره۱. ص ۴۰-۲۹.

۲-سالنامه آماری شیلات ایران. ۱۳۹۴. سازمان شیلات ایران، معاونت برنامه ریزی و توسعه مدیریت، دفتر برنامه و بودجه. چاپ اول، ۶۳ صفحه.

3.Akbari, S., Khoshnod, M.J., Rajaian, H., Afsharnasab, M. (2010). The use of eugenol as an anesthetic in transportation of with Indian shrimp(*Fenneropenaeus indicus*) post larvae. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 10; 423-429

4.Altun, T., Özlüer Hunt, A., Usta, F. (2006). Effects of clove oil and eugenol on anaesthesia and some hematological parameters of European eel, *Anguilla anguilla*, L., 1758. Journal of Applied Animal Research, 30(2); 171-176.

5.Boijink, C.L., Maciel, P.O., Tavares-Dias, M., Iwashitab, M.K.M., Morais, M.S., Hidee, D.M.V., et al. (2017). Anesthesia by sprinkling method in the gills of tambaqui *Colossoma macropomum* does not influence intensity and

morphology of monogeneans. Brazilian. Journal of Biology, 77(2); 367-371.

6.Briozzo, J.L., Chirife, J., Herzage, L., D'Aquino, M. (1989). Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. Journal of Apply Bacteriology, 66; 69–75.

7.Diemer, O., Hertes, N.D., Bittencourt, F., Signor, A., Rogerio Boscolo, W., Feiden, A. (2012). Eugenol as anesthetic for silver catfish(*Rhamdia voulezi*) with different weight. Journal of Semina Ciencias Agrarias, 33(4); 1495-1500.

8.Faheem, M., Jahan, N., Lone, K.P. (2016). Histopathological effects of biofenol-A on liver, kidney, and gills Indian major carp, *Catla catla*(Hatmilton, 1822). The Journal of Animal and Plant Sciences, 26(2); 514-522.

9.Hikasa, Y., Takase, K., Ogasawara ,T. (1986). Anesthesia and recovery with tricainemethane sulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. Japanese Journal of Veterinary Science, 48; 341-351.

10. Hseu, G.R., Yeh,S.L., Chu, Y.T., Ting, Y.Y. (1998). Comparison of efficacy of five anesthetics in goldlined sea bream, *Sparus sarba*. Acta Zoologica Taiwanica, 9(1); 35- 41.

11. Hseu, J.R., Yeh, S. L., Chu, Y.C., Ting, Y.T. (1994). The anesthetic effect of 2-phenoxyethanol in goldlined sea bream(*Sparus sarba*). Journal of Taiwan Fisheries Research, 2(2); 41-49. (In Chinese with English abstract).

12. Husen, A., Sharma. (2014). Efficacy of anesthetics for reducing stress in fish during aquaculture practices a review. Journal of Sciences, Engineering and Technology, 10(1); 104-123.

13. Keene, J.L., Noakes, D.L.G., Moccia, R.D., Soto C.G. (1998). The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum). Aquaculture Research, 29; 89–101.

14. Marking, L. L., Meyer, F. P. (1985). Are better anesthetics needed in fisheries?. Fisheries, 10(6); 2–5.

15. Martins, G. H., Mazoti, J. I., Bercini, V. M., Honorato, C. A. (2014). Eugenol anesthesia induction and recovery time for(*Piaractus brachypomus*). Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, 17(4); 241-245

16. Neiffer, D.L., Stamper, M.A. (2009). Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. Journal Institute of Laboratory Animal Resources (US), 50(4); 334-360.

17. Ogrentmen, F., Golbasi, S., Kutluyer, F. (2016). Efficacy of clove oil, benzocaine, eugenol, 2-phenoxyethanol as anaesthetics on shabbout fish (*Barbus grypus* Heckel, 1843). Iranian Journal of Fisheries Sciences, 15(1); 470-478.

18. Padiyoor, B.A., Benno, F., Pereira Jayaprakas, V. (2017). Assessment of clove oil and benzocaine anaesthesia on haematological and histopathological profile of *Haludaria fasciata*. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 10(4); 27-37.

19. Pattanasiri, T., Taparhudee, W., Suppakul, P. (2017). Acute toxicity and anaesthetic effect of clove oil and eugenol on siamese fighting fish, *Betta splendens*. Aquaculture international, 25;163–175.

20. Roberts, R.J. (2012). Fish Pathology, 4th Edition. Wiley-Blackwell, 590 P.

21. Saydmohammed, N., Kumar Pal, A. (2009). Anesthetic effect of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture, 298; 162–167.

22. Sneddon, L. U. (2012). Clinical anesthesia and analgesia in fish. Journal of Exotic Pet Medicine, 21(1); 32-43.

23. Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Groch, L., Nepejchalova, L. (2005). Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). Veterinary Medicine – Czech, 50(6); 269–275.

24. Velisek, J., Wlasow, T., Gomulka, P., Svobodova, Z., Novotny, L. (2007). Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis* L.). Veterinarni Medicina, 52(3); 103–110.

25. Weber, R.A., Peleteiro, J. B., García Martín, L.O., Aldegunde, M. (2009). The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). Aquaculture, 288; 147–150.

.

Survey on Anesthetic Effects in Different Concentrations of Eugenol on Fingerlings and Broodstocks Caspian Roach (*Rutilus caspicus*)

M. Mazandarani[1], I. Marzi[1], A.A. Hedayaty[1], M.R. Imanpoor[1], V. Jafari[1]

1.Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. **mazandarani57@gmail.com**

Received:2017.16.7 **Accepted: 2018.27.10**

Abstract

Inroduction & Objective: Due to the side effects of chemical drugs, in recent years, the use of herbal medicines and their compounds in fish has been widely considered. In the present study anesthetic effects of eugenol has been studied in fingerling and broodstock Caspian roach (*Rutilus caspicus*).

Material and Methods: In this regard, 100 fingerling with average weight of 10.4 ± 3.1 g and 75 broodstock Caspian roach with average weight of 60.5 ± 4.4 g prepared. After adaptation anaesthetic and recovery status were evaluated for each group of the fingerlings and broodstock in concentrations of 10, 20, 40, 80 and 100 ppm of eugenol. To evaluate the side effects of this drug, gill and kidney histology analysis were performed in the fish that anesthetized with 100 ppm of eugenol.

Results: Result showed eugenol in concentrations of 40 – 100 mg/l can induce anesthesia in less than 3 minutes in broodstocks. On the other hand, fingerlings fish were anesthetized in less than 3 minutes in all concentrations of 10 – 100 mg/l eugenol. For all studied concentrations of eugenol the recovery times were recorded in both fingerlings and broodstocks fish less than 5 minutes. In histological analysis of fingerlings fish that anesthetized with 100 mg/l of eugenol, epithelial lifting of secondary lamella in gill was recorded, also no histopathologic abnormality was observed in kidney tissue.

Conclusion: Based on this study, eugenol can be used as a safe anesthetic drug in concentrations of 40 to 100 ppm in the Caspian fish.

Keywords: *Eugenol, anesthesia, kidney and gill histology, Rutilus caspicus.*