بررسی تأثیر بیهوشی با MS_{222}، اسانس گل میخک و فنوکسی اتانول بر برخی شاخص‌های ایمنی ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio*

مجتبی علیشاهی[1*]
بهناز چشمه[2]
رحیم پیغان[1]
مسعود قربانپور[3]
تکاور محمدیان[4]

۱. دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، اهواز، ایران
۲. دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، دانش آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، اهواز، ایران
۳. دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، اهواز، ایران
۴. دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، اهواز، ایران

*** نویسنده مسئول مکاتبات**
alishahim@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۲۵
کد مقاله: ۱۳۹۲۰۴۰۱۰۱
این مقاله برگرفته از رساله دکتری عمومی است.

چکیده

این مطالعه به منظور ارزیابی اثر سه داروی بیهوشی MS_{222}، اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول بر برخی پاسخ های ایمنی ماهی کپور معمولی و تعیین ماده‌ای با کم‌ترین اثر را روی واکنش‌های ایمنی ماهی کپور انجام شد. در مطالعه حاضر که در سال ۹۱ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران انجام شد، تعداد ۴۰۰ عدد ماهی کپور معمولی با وزن حدود ۱۰۰ گرم استفاده گردید. ابتدا غلظت مناسب القای بیهوشی در مورد سه داروی بیهوشی محاسبه گردید، سپس با داروهای فوق ماهی‌های هر تیمار در مدت سه دقیقه تا مرحله بیهوشی سبک بیهوش شدند، یک تیمار بدون ماده بیهوشی تیمار کنترل در نظر گرفته شد. در زمان‌های۰، ۱، ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از بیهوشی از ساقه دمی ماهی‌ها خون‌گیری از ساقه دمی به عمل آمد. فاکتورهای ایمنی شامل فعالیت لایزوزیم و فعالیت ضد باکتریایی سرم، فعالیت کمپلمان، فعالیت نیترو بلوتترا زولیوم (NBT)، میزان پروتئین و گلوبولین سرم، در مراحل نمونه‌گیری بین تیمارها مقایسه و از نظر آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. غلظت مناسب بیهوشی داروهای بیهوشی MS_{222}، اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول در ماهی کپور معمولی را به ترتیب ۱۰۰، ۱۲۵ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر نشان داده شده. بیهوشی با سه دارو تأثیر معنی‌داری در فعالیت لایزوزیم سرم در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری نداشت ($P>۰/۰۵$). میزان فعالت باکتری‌کشی سرم در گروه فنوکسی اتانول تنها در زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از نمونه‌گیری کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P<۰/۰۵$) و در سایر مراحل تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. مقایسه سایر شاخص‌های ایمنی مورد مطالعه شامل فعالیت کمپلمان، فعالیت نیتروبلوتترازولیوم و میزان گلوبولین و پروتئین تام‌سرم در سه گروه مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، هر چند کاهش نسبی این فاکتورها در برخی مراحل نمونه‌گیری در تیمار فنوکسی اتانول مشاهده شد. MS_{222} و گل میخک تأثیری در شاخص‌های ایمنی ماهی کپور معمولی ندارند، ولی بیهوشی با فنوکسی‌اتانول باعث کاهش برخی شاخص‌های ایمنی ماهی کپور معمولی شده و در تحقیقات مربوط به ایمنی شناسی آبزیان استفاده از فنوکسی اتانول توصیه نمی‌شود.

واژگان کلیدی: کپور معمولی، بیهوشی، MS_{222}، اسانس گل میخک ، فنوکسی اتانول، شاخص‌های ایمنی، *Cyprinus cappio*.

مقدمه

توسعه روز افزون آبزی‌پروری در بسیاری از مناطق دنیا منجر به افزایش نیاز به‌کارگیری و استفاده از مواد دارویی جدید شده است، به طوری که در سال‌های اخیر بسیاری از مواد شیمیایی و ترکیبات صنعتی تحت مطالعات دقیق قرار گرفته تا از نظر جنبه‌های اقتصادی و دامنه سلامتی طبقه‌بندی و در آبزی‌پروری مورد استفاده قرار گیرند. داروهای بیهوشی با اهداف مختلف در آبزیان استفاده می‌گردند. استفاده از بیهوشی برای انجام عملیات تکثیر و پرورش ماهی به‌ویژه: رقم‌بندی، وزن‌کشی، خونگیری، تزریقات هورمونی و دارویی، واکسیناسیون، تکثیر مصنوعی، کارهای تحقیقاتی و آزمایشات بالینی و به‌منظور آسان‌کشی ماهی (Euthanasia) از اهمیت قابل ملاحظه‌ای برخوردار است

(میرزرگر و صیدگر، ۱۳۸۴؛ فاطمی و میرزرگر، ۱۳۸۹). انتخاب و بکارگیری مواد بیهوشی در آبزیان بیشتر با توجه به فاکتورهایی چون سرعت ایجاد بیهوشی، بهبودی سریع، غیر سمی بودن برای ماهی و انسان، بازماندگی کمتر در اندام‌ها، تجزیه سریع در محیط آبی و ارزان بودن انجام می‌گیرد (Satari *et al.*, 2009)، ولی کمتر به اثرات فیزیولوژیک این مواد در ماهی توجه می‌گردد. در اکثر تحقیقات تجربی روی ماهی نیز از داروهای بی‌هوشی استفاده می‌گردد (Molinero *et al.*, 1995) بدون اینکه به اثر این داروها بر فاکتورهای مختلف فیزیولوژیک و ایمونولوژیک ماهی توجه لازم شود (Ortuno *et al.*, 2002). تریکائین متان سولفات (MS_{222}) پرکاربردترین ماده بی‌هوشی در ماهی است، ولی قیمت بالا و دوره منع مصرف ماهی بعد از استفاده از MS_{222} (ابطحی و همکاران، ۱۳۸۱؛ میرزرگر و صیدگر، ۱۳۸۴) باعث تحقیق روی سایر مواد بیهوشی شده که قیمت و اثرات سوء کمتری داشته باشند. اسانس گل میخک به عنوان یک جایگزین مناسب در ایران بیشترین کاربرد را دارد (Sattari *et al.*, 2009). البته سایر داورهای بیهوشی ماهی در سایر کشورها استفاده می‌گردند (Ortuno و همکاران، ۲۰۰۲)، به طوریکه فنوکسی اتانول نیز در بسیاری از کشورها به عنوان یک ماده بیهوشی مورد اعتماد در آبزیان استفاده می‌گردد (فاطمی و میرزرگر، ۱۳۸۹). سه داری بیهوشی MS_{222}، اسانس گل میخک و فنوکسی اتانول از پرکاربردترین داروهای بیهوشی ماهی در کشور می‌باشند (قلی‌پور، ۱۳۸۹).

هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه تأثیر بیهوشی با سه داروی بیهوشی MS_{222}، اسانس گل میخک (داروی بیهوشی گیاهی مورد استفاده در کشور) و فنوکسی اتانول بر فاکتورهای ایمنی و سرمی ماهی کپور معمولی بوده تا علاوه بر بررسی اثرات احتمالی این داروهای بیهوشی بر فاکتورهای ایمنی ماهی کپور معمولی، داروی دارای کم‌ترین اثر تداخلی بر شاخص‌های خونی و سرمی ماهی انتخاب و برای استفاده در تحقیقات ایمونولوژی و صنعت آبزی‌پروری معرفی گردد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۴۵۰ قطعه ماهی کپور معمولی ۱۰۰ گرمی برای تعیین بهترین دوز بیهوشی برای داروهای بیهوشی مورد بررسی استفاده گردید. پس از تعیین بهترین دوز، تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ۱۰۰ گرمی به چهار تیمار ۳۰ قطعه‌ای تقسیم شد. این ماهی‌ها به دانشکده دامپزشکی اهواز منتقل و ذخیره‌سازی گردیدند.

ماهی‌ها به ظاهر سالم بوده و از نظر ابتلا به بیماری‌های انگلی و باکتریایی مورد بررسی قرار گرفته و به مدت یک هفته به منظور سازش‌یابی با شرایط در مخازن با خوراک معمولی تغذیه گردیدند.

داروهای بیهوشی مورد استفاده شامل، پودر MS_{222} از شرکت اصلی تولید کننده آن یعنی شرکت آرژنت آمریکا با نام تجاری فینکوئل خریداری گردید.

اسانس گل میخک از شرکت پارس ایمن دارو تهیه شد. اسانس فوق در آن شرکت به روش تقطیر آب و بخار با دستگاه کلونجر و با استفاده از ترکیبات هگزان، پنتان و آب و مخلوط آب- الکل به عنوان حلال و به نسبت‌های توصیه شده توسط فارماکوپه‌های معتبر در آزمایشگاه شرکت تولید و فراوری گیاهان دارویی شرکت فوق تهیه شده بود.

فنوکسی اتانول (Ethylene glycol monophenyl ether) با فرمول شیمیایی $C_8H_{10}0_2$ و کد S6048191 018 از شرکت مرک آلمان تهیه و بکار برده شد.

برای القای بیهوشی، مرحله‌ی بیهوشی سبک مبنا قرار گرفت. بعد از تعیین غلظت‌ها به ترتیب ماهی‌ها در مورد هر داروی بیهوشی به مخازن حاوی غلظت‌های تعیین شده ماده بیهوشی اضافه شده و بعد از مشاهده علائم بیهوشی سبک شامل: عدم پاسخ به تغییر وضعیت، کاهش در سطح تنفس، فقدان کامل تعادل، عدم واکنش به تحریک خارجی (Ross and Ross, 1999) بیهوشی سبک تلقی شده و بعد از ثبت زمان القای بیهوشی به آکواریوم‌های بازگشت از بیهوشی (ریکاوری) حاوی آب تازه دارای سیستم هوادهی منتقل شدند، زمان بازگشت از بیهوشی نیز بعد از تثبیت کامل تعادل و واکنش به تحریک خارجی ثبت گردید. با توجه به نتایج غلظت القای بیهوشی در ۳ دقیقه و ریکاوری در ۵ دقیقه غلظت بیهوشی مناسب دارو در نظر گرفته شد.

بعد از مشخص شدن غلظت‌های مناسب القای بیهوشی با سه داوری فوق، تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی حدود ۱۰۰ گرمی به چهار تیمار ۳۰ قطعه‌ای تقسیم شدند و قبل از بیهوشی (زمان صفر) از ۵ قطعه ماهی از هر تیمار خون‌گیری به‌عمل آمد. سپس ماهی‌های آکواریوم‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب با MS_{222}، اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی‌اتانول با دوز به‌دست آمده در مرحله قبل، بیهوش گردیدند، یک تیمار هم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (مجموعاً چهار تیمار). برای بیهوش کردن ماهیان از آکواریم‌های ۵۰ لیتری استفاده شد و به محض مشاهده علائم : عدم پاسخ به تغییر وضعیت، کاهش در سطح تنفس، فقدان کامل تعادل، عدم واکنش به تحریک خارجی و کاهش تونوس عضلات (Ross and Ross, 2008)، بیهوشی تلقی شده و به آکواریوم‌های بازگشت از بیهوشی (ریکاوری) حاوی آب تازه دارای سیستم هوادهی جهت انجام مراحل ریکاوری منتقل می‌گردیدند.

قبل از القای بیهوشی (زمان صفر)، از ۵ قطعه ماهی از هر گروه خون‌گیری به‌عمل آمد، سپس در ساعت‌های ۱، ۱۲، ۲۴ و ۷۲ بعد از بیهوشی، خون‌گیری از ورید ساقه دمی انجام شد. به منظور به حداقل رساندن استرس ناشی از عملیات آزمایش، تلاش شد که صید و تورکشی ماهیان از فضای تحت کنترل و محدود آکواریوم در کمال آرامش و با حداقل دنبال کردن و تعقیب و گریز ماهی صورت پذیرد، سپس با قرار دادن ماهی بر روی میز نمونه‌گیری و پوشاندن سر و چشم ماهی از تقلای آن جلوگیری و در حداقل زمان ممکن (۱ دقیقه) اقدام به خون‌گیری از ورید ساقه دمی ماهیان گروه‌های تیمار و شاهد مربوط به آن‌ها در ساعات ذکر شده با سرنگ‌های ۲/۵ سی‌سی آغشته به هپارین شد. نمونه خون بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و پس از جداسازی سرم، جهت آزمایشات ایمنی‌شناسی مورد استفاده قرار گرفت. سرم خون در سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جدا شد. سپس نمونه‌های ساعات مختلف، شماره‌گذاری و سرم‌ها در ۲۰- درجه سانت‌گراد جهت اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی نگهداری گردید.

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوزیم سرم از روش کدورت‌سنجی Ellis (۱۹۹۰) و Nayak و همکاران (۲۰۰۸)، استفاده گردید. در این روش ابتدا سرم با سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری میکروکوکوس لیزوداکتیکوس (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سیترات (pH= ۵/۸) در گوده‌های پلیت الایزا با نسبت ۱:۱۰ مخلوط‌گردید و جذب نوری آن‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اتاق در زمان‌های ۰ و۶۰ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم لیزوزیم باعث تخریب باکتری و کاهش جذب نوری گردید. میزان فعالیت لیزوزیم سرم با توجه به منحنی استاندارد میزان فعالیت لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ سیگما تعیین گردید (Nayak و همکاران، ۲۰۰۸).

برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش توصیه‌شده توسط Kajita و همکاران (۱۹۹۰)، با کمی تغییرات استفاده گردید. ابتدا باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا به مدت ۴۸ ساعت در محیط Tripticase Soy Broth (TSB) کشت داده شد و سپس سلول‌های باکتریایی با سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری و با افزودن مقداری بافر فسفات سدیم استریل به آن‌ها جذب نوری سوسپانسیون حاصله در طول موج ۵۴۰ نانومتر برابر ۱ تنظیم گردید. تعداد باکتری در سوسپانسیون حاصل شمارش‌شده و با استفاده از روش تهیه رقت‌های متوالی بر مبنای ده، سوسپانسیون 10^5 cfu/ml باکتری در ژلاتین ورونال بافر ۰/۱ درصد استریل (pH =۷/۵ و حاوی ۰/۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر یون کلسیم و ۰/۱۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر یون منیزیم) تهیه‌گردید. نمونه‌های سرمی به نسبت ۱:۳ با بافر فوق رقیق گردیدند. سوسپانسیون باکتریایی حاصل به نسبت ۱:۱ با سرم رقیق شده مخلوط شده و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با حرکت ملایم انکوبه گردیدند. سپس یک لوپ کامل از مخلوط سرم و باکتری در محیط کشت Tripticase Soy Agar (TSA) کشت داده شد. محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیده و سپس به کمک دستگاه کلونی‌کانتر تعداد پرگنه‌ی باکتریایی رشد یافته در روی محیط کشت شمارش گردید. نتایج به‌صورت متوسط تعداد پرگنه باکتری شمارش‌شده برای هر نمونه مشخص شده و تعداد باکتری شمارش شده در هر تیمار نسبت به تیمار شاهد مقایسه گردید.

مقادیر پروتئین تام و آلبومین توسط کیت‌های تجاری زیست‌شیمی و به روش Bradford (۱۹۷۶)، انجام شد. با به‌دست‌آوردن تفاضل این دو، مقدار گلوبولین به دست آمد (Nayak و همکاران ۲۰۰۸).

جهت اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان از آزمایش همولیز در ژل آگار بهره‌گیری شد.(Barta, 1993). ابتدا آگارز ۱/۵ درصد در بافر فسفات (pH=۷/۲ حاوی ۰/۵ میلی‌مول کلریدمنیزیم و ۱/۵ میلی‌مول کلریدکلسیم) تهیه شد. در دمای ۵۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد به میزان ۱/۵ درصد

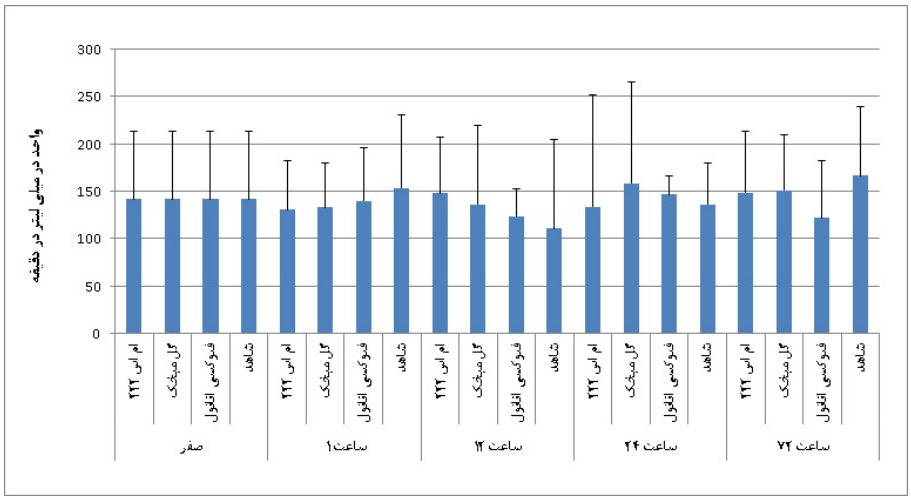
از گلبول قرمز خرگوش شسته شده با بافر فسفات (با تراکم $۱۰^{۸}$ ×۱ سلول در هر میلی‌لیتر) به آگارز اضافه شد. مخلوط آگارز حاوی گلبول‌های قرمز خرگوش داخل پلیت توزیع گردید. پلیت‌ها به مدت یک شب در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس حفرات به قطر ۳ میلی‌متر و با فاصله ۲ سانتی‌متر از هم در پلیت‌ها ایجاد شده و به هر گوده میزان ۲۰ میکرولیتر از سرم نمونه اضافه شد. پلیت‌ها در محیط مرطوب و دمای ۲۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده و قطر هاله لیز گلبولی اندازه‌گیری شد.

از روش توصیه شده توسط Uspur و همکاران (۲۰۰۵)، استفاده گردید. به‌طور خلاصه ۰/۱ میلی‌لیتر از خون در داخل گوده‌های میکروپلیت الایزا قرار داده شد و ۰/۱ میلی‌لیتر نیز محلول NBT ۰/۲ درصد به گوده اضافه گردید. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد و آن‌گاه ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل برداشت و به یک لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر دی‌متیل فرمامید اضافه شد. بعد از سانتریفوژ جذب نوری مایع رویی درطول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای بررسی اختلاف فاکتورهای خون‌شناسی و ایمنی‌شناسی بین تیمارهای مورد بررسی در هر مرحله خون‌گیری از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ و آزمون ANOVA یک‌طرفه و آزمون تکمیلی دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید.

نتایج

نتایج مربوط به اندازه‌گیری فاکتورهای ایمنی مورد بررسی در تیمارهای مختلف بیهوش شده با سه داروی بیهوشی MS_{222}، اسانس گل میخک و فنوکسی اتانول در مراحل مختلف نمونه‌گیری در جدول ۱ و شکل ۱ آورده شده است، همان‌طور که مشخص است، بیهوشی با سه داروی MS_{222}، اسانس گل‌میخک و ۲- فنوکسی‌اتانول، تأثیر معنی‌داری در فعالیت لایزوزیم سرم در مراحل مختلف نمونه‌گیری نداشته است ($P>۰/۰۵$).



شکل ۱: میزان فعالیت لیزوزیم سرم (میانگین ± انحراف معیار) بین تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه‌گیری ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (تیمارهای بیهوش شده با MS_{222}، گل‌میخک و فنوکسی اتانول).

جدول ۱: اثر سه داوری بیهوشی MS_{222}، اسانس گل‌میخک و ۲- فنوکسی اتانول بر فاکتورهای ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus Caprio*).

زمان	گروه	لیزوزیم واحد در میلی لیتر	قدرت باکتری کشی سرم تعداد باکتری شمارش شده	توتال پروتئین گرم در دسی لیتر	آلبومین گرم در دسی لیتر	گلوبولین گرم در دسی لیتر	کمپلمان واحد در میلی لیتر	NBT جذب نوری
۰ ساعت	MS_{222}	۱۴۱/۷±۷۱/۶۲^{a}	۳۵/۵۹±۱۰/۷۲^{a}	۳/۸۳±۰/۷۰^{a}	۱/۳۳±۰/۳۳^{a}	۲/۵۱±۰/۷۵^{a}	۲۵/۱۴±۴/۱۷^{a}	۲۹/۳۳±۲/۰۸^{a}
	گل میخک	۱۴۱/۷±۷۱/۶۲^{a}	۳۵/۵۹±۱۰/۷۲^{a}	۳/۸۳±۰/۷۰^{a}	۱/۳۳±۰/۳۳^{a}	۲/۵۱±۰/۷۵^{a}	۲۵/۱۴±۴/۱۷^{a}	۲۹/۳۳±۲/۰۸^{a}
	فنوکسی اتانول	۱۴۱/۷±۷۱/۶۲^{a}	۳۵/۵۹±۱۰/۷۲^{a}	۳/۸۳±۰/۷۰^{a}	۱/۳۳±۰/۳۳^{a}	۲/۵۱±۰/۷۵^{a}	۲۵/۱۴±۴/۱۷^{a}	۲۹/۳۳±۲/۰۸^{a}
	شاهد	۱۴۱/۷±۷۱/۶۲^{a}	۳۵/۵۹±۱۰/۷۲^{a}	۳/۸۳±۰/۷۰^{a}	۱/۳۳±۰/۳۳^{a}	۲/۵۱±۰/۷۵^{a}	۲۵/۱۴±۴/۱۷^{a}	۲۹/۳۳±۲/۰۸^{a}
۱ ساعت	MS_{222}	۱۳۰/۴±۵۲/۴۷^{a}	۳۱/۸۸±۴/۶۰^{a}	۴/۱۵±۱/۰۲^{a}	۱/۲۹±۰/۱۷^{a}	۲/۸۵±۱/۱۸^{a}	۲۵/۵۵±۲/۷۹^{a}	۲۹/۲۰±۸/۴۷^{a}
	گل میخک	۱۳۳/۳±۴۷/۱۴^{a}	۳۰/۰۰±۶/۹۳^{a}	۴/۲۸±۰/۲۱^{a}	۱/۴۱±۰/۱۹^{a}	۲/۸۷±۰/۴۱^{a}	۲۷/۱۶±۳/۶۲^{a}	۲۹/۶۰±۵/۳۲^{a}
	فنوکسی اتانول	۱۴۰/۰±۵۶/۵۷^{a}	۳۴/۳۳±۱۷/۰۴^{a}	۳/۹۵±۰/۰۹^{a}	۱/۵۳±۰/۰۹^{a}	۲/۴۲±۰/۰۷^{a}	۲۶/۴۶±۴/۱۰^{a}	۲۹/۸۰±۸/۷۰^{a}
	شاهد	۱۵۳/۳±۷۶/۸۸^{a}	۳۶/۰۰±۱۳/۳۷^{a}	۳.۹۲±۰/۹۴^{a}	۱/۲۳±۰/۳۹^{a}	۲/۷۰±۱/۳۱^{a}	۲۵/۶۱±۲/۲۸^{a}	۲۹/۷۵±۲/۵۰^{a}
۱۲ ساعت	MS_{222}	۱۴۷/۸±۵۹/۲۹^{a}	۲۹/۰۰±۹^{a}	۳/۸۹±۰/۷۷^{a}	۱/۳۸±۰/۴۶^{a}	۲/۵۱±۱/۲۲^{a}	۲۶/۸±۱/۵۵^{a}	۳۰/۷۵±۷/۱۴^{a}
	گل میخک	۱۳۶/۲±۸۳/۸^{a}	۳۵/۰۰±۶/۰۸^{a}	۴/۱۶±۰/۴۲^{a}	۱/۴۹±۰/۲۳^{a}	۲/۶۹±۰/۵۴^{a}	۲۶/۹۸±۵/۲۶^{a}	۳۱/۶۰±۳/۲۱^{a}
	فنوکسی اتانول	۱۲۳/۹±۲۸/۲^{a}	۳۲/۰۰±۱۳/۱۱^{a}	۳/۵۶±۱/۰۷^{a}	۱/۵۰±۰/۶۰^{a}	۲/۰۵±۱/۰۹^{a}	۲۵/۴۶±۳/۶۷^{a}	۲۷/۴۰±۳/۹۷^{a}
	شاهد	۱۱۰/۶±۹۳/۸۴^{a}	۳۰/۶۷±۱۴/۵۷^{a}	۳/۹۱±۰/۹۰^{a}	۱/۳۳±۰/۴^{a}	۲/۵۷±۰/۷۸^{a}	۲۷/۹۳±۶/۰۲^{a}	۲۹/۹۵±۴/۵۰^{a}
۲۴ ساعت	MS_{222}	۱۳۳/۸±۱۱۷/۴۳^{a}	۳۳/۵۰±۱۲/۹^{a}	۴/۱۳±۰/۳۹^{a}	۱/۴۸±۰/۲۷^{a}	۲/۶۵±۰/۵۹^{a}	۲۶/۱۵±۶/۳۲^{a}	۳۰±۴/۷۶^{a}
	گل میخک	۱۵۸/۳±۱۰۷/۵۸^{a}	۴۰/۲۰±۵/۶^{a}	۳/۹۴±۰/۱۹^{a}	۱/۳۰±۰/۴۵^{a}	۲/۶۴±۰/۲۹^{a}	۲۸/۲۱±۱۰/۴۲^{a}	۳۰/۶±۵/۸۶^{a}
	فنوکسی اتانول	۱۴۶/۵±۲۰/۱^{a}	۳۱/۷۵±۱۴/۵^{b}	۴/۱۳±۰/۳۶^{a}	۱/۳۶±۰/۳^{a}	۲/۷۶±۰/۲۴^{a}	۲۴/۳±۴/۳۵^{a}	۲۷±۶/۸۳^{a}
	شاهد	۱۳۶/۳±۴۳/۶^{a}	۳۲/۳۲±۸/۲۲^{a}	۳/۹۰±۰/۰۱^{a}	۱/۲۶±۰/۱^{a}	۲/۶۴±۰/۰۹^{a}	۲۵/۳±۵/۵۵^{a}	۲۹/۷۵±۲/۵۰^{a}
۷۲ ساعت	MS_{222}	۱۴۸/۴±۶۵/۰۷^{a}	۳۳±۸/۷۵^{a}	۴/۱۲±۰/۲^{a}	۱/۳۵±۰/۵۳^{a}	۲/۷۷±۰/۶۹^{a}	۲۴/۵۱±۶/۷۶^{a}	۲۹±۳/۹۴^{a}
	گل میخک	۱۵۱/۱±۵۸/۷۲^{a}	۴۳/۴±۶/۷۳^{a}	۴/۲۲±۰/۱۳^{a}	۱/۴۴±۰/۱۷^{a}	۲/۷۸±۰/۱۷^{a}	۲۵±۹/۲۲^{a}	۳۲/۷۵±۸/۴۲^{a}
	فنوکسی اتانول	۱۲۱/۱±۶۰/۷۸^{a}	۴۷/۲±۷/۶۷^{b}	۴/۰۹±۰/۲۲^{a}	۱/۲۳±۰/۲۱^{a}	۲/۸۵±۰/۴۳^{a}	۲۱/۵۶±۹/۸۵^{a}	۲۷±۶/۲۷^{a}
	شاهد	۱۶۶/۷±۷۲/۱۷^{a}	۳۲/۶۴±۵/۷۸^{a}	۳/۵۸±۰/۹۶^{a}	۱/۴۹±۰/۴۵^{a}	۲/۱۳±۰/۸۳^{a}	۲۳/۷۵±۲/۸۱^{a}	۲۹/۷۵±۲/۵۰^{a}

بی‌هوشی با داروی فنوکسی‌اتانول باعث کاهش میزان قدرت باکتری‌کشی سرم شده ولی در تیمارهای MS_{222} و اسانس گل میخک تأثیر معنی‌داری در قدرت باکتری کشی سرم در مراحل مختلف نمونه‌گیری نداشته است ($p>۰/۰۵$).

براساس نتایج بی‌هوشی با سه داروی MS_{222}، اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول، تغییراتی درمیزان توتال‌پروتئین، آلبومین و گلوبولین و میزان فعالیت کمپلمان سرم و فعالیت نیتروبلو تترازولیوم (NBT) در مراحل مختلف نمونه‌گیری مشاهده گردید اما این تغییرات از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

تأثیر داروهای بیهوشی بر سیستم ایمنی حیوانات خونگرم مورد توجه زیادی بوده است ولی در مورد آبزیان کمتر به آن توجه شده است، در تحقیق حاضر نیز بیهوشی با سه داروی بیهوشی تأثیر مختصری بر فاکتورهای ایمنی ماهی کپور داشته است.

در مطالعه‌ی حاضر، علی‌رغم تفاوت مختصر میزان فعالیت لایزوزیم در تیمارهای MS_{222}، گل میخک و فنوکسی‌اتانول نسبت به تیمار کنترل در مراحل مختلف نمونه‌گیری، این تفاوت، روند ثابتی نداشت و از نظر آماری نیز معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در مطالعات مشابه نتایج مختلفی گزارش شده است، به طوریکه در مطالعه‌ی Coho و Heath (۲۰۰۰)، در ماهی آزاد چینوک مقدار لیزوزیم در ۱ و ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی با اسانس گل میخک و MS_{222} افزایش معنی‌داری نشان داد. در مطالعه Bressle و Rhun (۲۰۰۴)، مقدار لیزوزیم سرم خون ماهی سیم دریایی بلافاصله بعد از بیهوشی با اسانس گل میخک (۰/۴۴۵ میلی‌مول) تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشته‌است. Toumas و Robertson (۱۹۹۱) مدعی شده‌اند که مواد بیهوشی تأثیرات استرس‌زایی را در ماهی ایجاد می‌کنند و متعاقب آن سیستم ایمنی ماهی را تحت تأثیر قرار می‌دهند.

Demers و Byne در سال ۱۹۹۷ و Kubulaye و Ulkay در سال ۲۰۰۲ افزایش معنی‌داری مقدار لیزوزیم سرم در نتیجه مواجهه با عوامل استرس‌زای محیطی را درماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش نمودند. Alishahi و همکاران (۲۰۱۰) افزایش فعالیت لایزوزیم به‌دنبال تحریک ایمنی با محرک‌های ایمنی را گزارش نمودند. در مطالعه قلی‌پور در سال ۱۳۸۹ نیز افزایش فعالیت لایزوزیم و کاهش قدرت بیگانه‌خواری گلبول‌های سفید خونی ماهی قزل‌آلا بعد از بیهوشی الکتریکی و بیهوشی با گل میخک گزارش شده است. تفاوت نتایج تحقیقات مختلف روی اثر بی‌هوشی بر سطح لایزوزیم سرم را می‌توان به تفاوت گونه‌های مورد بررسی، مرحله بیهوشی مورد نظر، نوع و غلظت داروی مورد بررسی، شرایط محیطی آزمایش و نیز شرایط فیزیولوژیکی ماهی نسبت داد (قلی‌پور، ۱۳۸۹).

قدرت باکتری‌کشی سرم که نشان‌دهنده ایمنی هومورال غیراختصاصی ماهی می‌باشد و دفاع غیراختصاصی سرم در برابر عفونت‌های میکروبی را نمایان می‌نماید، در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت که میزان فعالیت باکتری‌کشی سرم در تیمار فنوکسی‌اتانول در زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از بی‌هوشی کاهش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان داد (p <۰/۰۵). قدرت باکتری‌کشی سرم حاصل مجموعه‌ای از عوامل ایمنی غیر سلولی و هومورال می‌باشد که اختلال در رشد و بقای عوامل میکروبی وارد شده به خون را باعث می‌شوند. عواملی همچون اجزای سیستم کمپلمان، انزیم‌های پروتئولیتیک و ایمنی، پادتن‌های طبیعی و .... می‌توانند باعث تولید توان ضدباکتریایی سرم شوند (Misra *et al.*, 2006). در مورد اثر داروهای بیهوشی بر قدرت ضد باکتریایی سرم ماهی تحقیقی یافت نشد، ولی در گزارشاتی از تأثیر بی‌هوشی بر شاخص‌های ایمنی هومورال یاد شده است، قلی‌پور (۱۳۸۹) در مطالعه‌ای بیهوشی الکتریکی و بیهوشی با گل میخک را باعث نوعی سرکوب ایمنی و کاهش پروتئین‌های ایمنی در ماهی قزل‌آلا دانست. Molinero و Gonzaless (۱۹۹۵) در تحقیقی دیگر نیز بیهوشی با فنوکسی اتانول را عاملی جهت ایجاد استرس و سرکوب پاسخ ایمنی ماهی دانستند.

فاکتورهای بیوشیمایی دیگر سرم شامل توتال پروتئین و آلبومین و گلوبولین نیز در این تحقیق تحت تأثیر بیهوشی با سه داروی مورد بررسی قرار نگرفتند. اندازه‌گیری میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین سرم به‌منظور تعیین مرحله بیماری یا تشخیص برخی نواقص ایمنی، اختلال در عملکرد کبد و اختلال در فعالیت بافت‌های خونساز کاربرد دارد (بنایی و همکاران، ۱۳۹۰). فرهادی (۱۳۹۰)، عدم تأثیر بیهوشی با گل میخک و MS_{222} را بر میزان پروتئین تام و گلوبولین سرم ماهی کپور علفخوار را گزارش نمود. عوامل سرکوب‌گر ایمنی به روش‌های مختلفی بر میزان گلوبولین و همچنین میزان پروتئین تام سرم تأثیر می‌گذارند. معمولا کاهش تعداد لمفوسیت‌های خونی، کاهش گلوبولین تام خون ماهی باعث می‌شود. Gomulka و همکاران (۲۰۰۸)، بیهوشی با اسانس گل میخک را باعث ایجاد نوعی لمفوپنی در ماهی خاویاری

سیبری دانستند که نتیجه آن کاهش میزان ایمونوگلوبولین تام و نهایتاً کاهش پروتئین تام سرمی است. قلی پور (۱۳۸۹)، نیز کاهش تعداد گلبول‌های سفید و نسبت لمفوسیت‌ها در خون ماهی قزل‌آلا را دلیلی بر سرکوب ایمنی و کاهش ایمونوگلوبولین‌ها بدنبال بیهوشی الکتریکی گزارش نمودند. در تحقیق جاری بیهوشی با غلظت‌های بدست آمده از داروهای MS_{222}، گل میخک و فنوکسی اتانول با شرایط تعریف شده در تحقیق، تأثیری بر سطح پروتئین‌های سرم نداشتند، لذا از هر سه داروی بیهوشی در غلظت پیشنهاد شده می‌توان در بررسی‌ها مربوط به اندازه‌گیری سطح پروتئین‌های سرم استفاده نمود.

همچنین در تحقیق جاری بیهوشی با سه داروی مورد بررسی تأثیری در میزان فعالیت همولیتیک کمپلمان ماهی نداشتند ($P>۰/۰۵$) هر چند کاهش نسبی میزان فعالیت همولیتیک کمپلمان در ماهیان بیهوش شده با داروی بیهوشی فنوکسی اتانول در مراحل مختلف نمونه‌گیری مشاهده گردید. که می‌تواند نشان‌دهنده اثر نسبی داروی فنوکسی اتانول نسبت به سایر داروها بر پاسخ ایمنی ماهی باشد. در انسان بی‌حسی اپیدورال (Epidoral) می‌تواند اثر مهارکننده‌ای بر سیستم کمپلمان و فعالیت همولیتیک آن داشته باشد که این کاهش در اثر تداخل عمل و توقف اعصاب سمپاتیک (Sympatic) اتفاق می‌افتد (Hauptmann *et al*., 1985; Gajdosz *et al*., 1994). تأثیر داروهای بیهوشی در کاهش فعالیت کمپلمان سرم که یکی از مهم‌ترین شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی ماهی است می‌تواند به القای استرس و تولید کتکولامین‌های مرتبط با استرس مثل کورتیزول باشد، افزایش کورتیزول تأثیر منفی در تولید سایتوکین‌های میانجی سلول‌های ایمنی داشته و تولید پروتئین‌های مرتبط ایمنی را کاهش می‌دهد، لذا یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های ایمنی که گروه کمپلمان‌های هستند نیز کاهش یافته و کاهش فعالیت آن را باعث می‌شود.

ارزیابی انفجار تنفسی به وسیله شاخص نیتروبلوتترازولیوم (NBT) در ماهیان بیهوش شده با سه داروی بیهوشی مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه‌گیری از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان ندادند، هر چند کاهش نسبی شاخص NBT در تیمار بیهوش شده با فنوکسی اتانول در ساعت ۲۴ و ۷۲ بعد از بیهوشی مشاهده گردید. در مطالعه Ortanu و همکاران (۲۰۰۲)، تأثیر MS_{222} با دوز ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در ماهی سیم دریایی، یک ساعت بعد از بیهوشی فعالیت نیتروبلو تترازولیوم تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد. که این نتیجه با نتایج ما هم‌خوانی دارد و در مطالعه Bressler و Rhun (۲۰۰۴)، فعالیت انفجار تنفسی لوکوسیت‌های قدام کلیه ماهی سیم دریایی (*Sea bass*) بلافاصله بعد از بیهوشی با اسانس گل میخک تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد. Palic و همکاران (۲۰۰۶)، در مطالعه‌ای تأثیر استفاده از MS_{222} (۷۵ میلیگرم در لیتر) و استرس تراکم و حمل و نقل را در ماهی قنات سرچربی (Fat head minnow) بر فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها مورد بررسی قرار داده و مشاهده کردند که MS_{222} به همراه استرس تراکم باعث کاهش فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها می‌شود، این محققین تأثیر افزایش کورتیکوستروئیدها را دلیل کاهش عملکرد مهاجرت ، فاگوسیتوز و انفجار تنفسی لکوسیت‌ها دانستند.

به عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت سه داروی بیهوشی مورد استفاده در این تحقیق کارایی لازم بیهوشی استاندارد در ماهی را داشته ولی در بین این سه دارو، فنوکسی اتانول اثرات منفی بر برخی فاکتورهای ایمنی ماهی کپور دارد، لذا توصیه می‌شود در تحقیقاتی که روی پاسخ‌های ایمنی ماهی انجام می‌گیرد از دو داروی MS_{222} و اسانس گل میخک استفاده گردد.

منابع

ابطحی، ب.، چیت ساز، ح.، سلطانی، م. و امیدبیگی، ر.، ۱۳۸۱. مقایسه LC50 اسانس گل میخک و MS_{222} در بچه ماهیان تاس‌ماهی ایرانی، قزل آلای رنگین‌کمان و کپور معمولی. مجله علمی شیلات ایران. شماره ۳، صفحات: ۱۳-۱.

بنایی، م.، میرواقفی، ع.، مجازیامیری، ب.، رفیعی، غ. و نعمتدوست، ب.، ۱۳۹۰. بررسی خون‌شناسی وآسیب شناسی بافتی درمسمومیت تجربی با دیازینون درماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*)، نشریه شیلات. دوره ۶۴، شماره ۱، صفحات: ۳-۱.

ستاری، م.، ۱۳۸۵. ماهی‌شناسی (۱)، تشریح وفیزیولوژی. چاپ دوم، انتشارات حق شناس، رشت، صفحات: ۲۲۴- ۲۰۶.

فاطمی، آ. و میرزرگر ۱۳۸۹. فارماکولوژی کاربردی دامپزشکی، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ اول، صفحات ۱۳۰-۱۲۵.

فرهادی راد، آ.، ۱۳۹۰. مقایسه تأثیر سه داروی بیهوشی تریکائین متان سولفات، اسانس گل میخک و ۲-فنوکسی اتانول بر فاکتورهای ایمنی ماهی کپور علف‌خوار، پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد، واحد علوم و تحقیقات خوزستان.

قلی‌پور، ح.، (۱۳۸۹). مطالعه اثر بیهوشی ناشی ازالکتریسیته، اسانس گل میخک وتریکائین متان سولفانات بر برخی پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پایان نامه دکتری دانشکده دامپزشکی تهران، ۷ ص.

میرزرگر، س.، س. و وصیدگر، م.، ۱۳۸٤. فنون بیهوشی وتسکین در آبزیان، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۲۵-۷.

Alishahi, M., Ranjbar, M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R., Mesbah, M. and Razijalali, M., 2010. Effects of dietary Aloe vera on specific and nonspecific immunity of Common carp (Cyprinuscarpio). Journal of Veterinary Research, 4(3):85-91.

Bradford, M., M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein. Analytical biochemistry, 72: 248-254.

Brata, O., 1993. Veterinary Clinical Immunology laboratory, Bar- Lab Inc, Vol2, Section 3: 24-25

Bressler, K. and Ron, B., 2004. Effect of anesthetics on stress and the innate immune system of Gilthead Seabream (Sparus Surata). Israeli Journal of Aquaculture-BAMIGDEH, 56(1), 5-13.

Coho, G. K. and Heath, D. D., 2000. Comparison of tricainemethanesulphonate (MS_{222}) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus shawytscha* (Walbaum). Aquac. Res. 31, pp: 537–546.

Demers, N. E. and Bayne, C. J., 1997. The immediate efects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbowtrout. Developmental and Comparative Immunology, 21: 363– 373.

Ellis, A. E., 1990. Lysozyme assay. In: Stolen, J.S.; Fletcher, DP.; Anderson, BS. and Robertson, BS. (Eds). Techniques in Fish Immunology. 1st Vol., SOS Publication, Fair Haven, NJ, California, PP: 101–103.

Gajdosz, R., 1994. Evaluation of regional analgesia and surgical trauma on selected factors of the human immune system. Folia Medica Cracoviensia 35: 69–86.

Gomulka, P., Wlasow, T., Velíšek, J., Svobodová, Z. and chmielinska, E., 2008. Effects of Eugenol and MS_{-222} Anaesthesia on Siberian Sturgeon (*Acipenserbaerii* Brandt) ACTA VET. BRNO, PP: 447–453.

Hauptmann, G., Goetz, J., Steib, A. and Otteni, J. C., 1985. Drugs inhibiting complement activation. Annales Francaises d'Anesthesie et de Reanimation 4: 210–213.

Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayash, M., 1990. The immunonodulatory effects of levamisole on rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*). Fish Pathology, 25: 93-98.

Kubulay, A. and Ulukoy, S. G., 2002. The Effects of Acute Stress on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Turk Journal of zoology, 26: 249-254.

Misra, C. K., Das, B. K., Mukherjee, S. C. and Meher, P. K., 2006. Theimmunomodulatory effects of tuftsin on the non-specific immune system of Indian Major carp, Labeorohita. Fish and Shellfish Immunology, 20: 728-738.

Molinero, A. and Gonzalez, J., 1995. Comparative effects of MS_{222} and 2-phenoxyethanol on gilthead sea bream (Sparusaurata L.) during confinement. Comparative Biochemistry and Physiology A-Comparative Physiology, 111 (3):405-414.

Nayak, S. K., Swain, P. and Mukherjee, S. C., 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeorohita* (Ham.). Fish & Shellfish Immunology, 23: 892- 896.

Nayak, S. K., Swain, P., Nanda, P. K., Dash, S., Shukla, S., Meher, P. K. and Maiti, N. K., 2008. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. Fishand Shellfish Immunology, 24: 394-399.

Ortuno, J., Esteban, M. A. and Meseguer, J., 2002. Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (Sparusaurata L.). Fish and Shellfish Immunology, 12(1): 49-59.

Palić, D., Herolt, D. M., Andreasen, C. B., Menzel, B. W. and Roth, J. A., 2006. Anesthetic efficacy of tricaine methane sulfonate metomidate and eugenol effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (Pimephalespromelas Rafinesque 1820). Aquaculture, 254: 675-685.

Ross, L. G. and Ross, B., 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. Third edition Black well science publication, oxford, London, UK.

Sattari, A., Mirzargar, S. S., Abrishamifar, A., Lourakzadegan, R., Bahonar, A., Mousavi, H. E. and Niasari, A., 2009. Comparison of electroanesthesia with chemical anesthesia (MS_{222} and Clove Oil) in rainbow

trout (*Oncorhynchus mykiss*) using plasma cortisol and glucose responses as physiological stress indicators. Asian Journal of Animal andVeterinaryAdvance, 4: 306-313.

Thomas, P. and Robertson, L. 1991. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaeno psocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS_{222}, quinaldinesulphate and metomidate. Aquaculture, PP: 96, 69–86.

Uspur, U. and Mustafa D. R. C., 2005. A Study on the Effects of Levamisole on the Immune System of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss)*, Walbaum Turk J Vet Anim Sci 29 (2005) 1169-1176© T.BÜTAK 1169.