بررسی اثر آرام‌بخشی عصاره گل میخک و تنباکو و تریکائین متان سولفونات (MS222) بر برخی آنزیم‌های سرمی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون کپور معمولی

بهناز شهریاری‌زاده[۱*]، رحیم پیغان[۲]، سیده میثاق جلالی[۳]، سید رضا فاطمی طباطبایی[۴]

۱. دانش‌آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران.
۲. استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران.
۳. استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران.
۴. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران.

دریافت: ۱۸ دی ماه ۹۵ **پذیرش:** ۲۶ دی‌ماه ۹۶

چکیده

در این پژوهش اثر آرام‌بخشی عصاره گل میخک، تنباکو و تریکائین متان سولفونات بر برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم ماهی کپور معمولی بررسی شد. ۲۱۰ قطعه ماهی کپور معمولی به ۷ تیمار ۱۰ تایی (هر کدام با ۳ تکرار) تقسیم شدند (دو غلظت آرام‌بخشی عصاره گل میخک ۲۰ mg/l و ۴۰، دو غلظت عصاره تنباکو ۴۰ mg/l و ۸۰ و دو غلظت تریکائین متان سولفونات یا MS222 mg/l ۲۰ و ۴۰ و یک گروه شاهد مطالعه). آرام‌بخشی به مدت ۲ روز متوالی انجام شد و در روزهای ۲، ۴ و ۶ پس از شروع آرام‌بخشی خون‌گیری از ماهیان انجام گرفت. پس از جداسازی سرم، فراسنجه‌های بیوشیمیایی شامل پروتیین تام، گلوکز و فعالیت آنزیم‌های AST، ALT، CPK، ALP و هورمون کورتیزول نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. در بررسی نتایج در مقادیر آنزیم ALT و کورتیزول در گروه‌های آزمایشی نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد؛ لیکن در میزان AST در تیمار عصاره تنباکو ۴۰ mg/l کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد، در میزان فعالیت آنزیمALP در تیمارهای عصاره میخک و تیمارهای تنباکو نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار، میزان پروتئین تام در تیمار عصاره میخک ۴۰ mg/l و تیمارهای تنباکو نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار و میزان گلوکز MS222 mg/l ۲۰، تیمارهای عصاره میخک و تیمار عصاره تنباکو ۸۰ mg/l نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$). در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که اگرچه استفاده از عصاره میخک یا تنباکو در غلظت‌های مورد مطالعه، موجب ایجاد افزایش در فعالیت برخی آنزیم‌های سرمی می‌گردد، اما از نظر کیفیت آرام‌بخشی تفاوتی با MS222 ندارد.

واژه‌های کلیدی: اثر آرام‌بخشی، عصاره میخک، عصاره تنباکو، ماهی کپور معمولی.

مقدمه

در مراکز تکثیر و پرورش ماهی برای کاهش تنش و آرام‌سازی ماهیان مولد طی اجرای عملیات تکثیر، جراحی و حمل و نقل ماهیان و نیز برای اهداف پژوهشی استفاده از مواد آرام‌بخش برای به حداقل رساندن صدمات و تلفات ناشی از چنین فعالیت‌هایی ضروری به نظر می‌رسد (۷). به این منظور بررسی اثر آرام‌بخش داروها در کاهش استرس ماهی در آبزی پروری ضرورت دارد. استرس موجب مصرف انرژی حیاتی ماهی می‌شود (۲) و ایمنی بدن را نیز کاهش می‌دهد (۳۱). میخک *Eugenia caryophyllata* درختی است که صمغ، تانن، موم، کاریو فیلین و اسانس (شامل ۷۰ تا ۹۷ درصد اوژنول) دارد (۳). اوژنول از دسته داروهای فنولی و ماده اصلی تشکیل‌دهنده عصاره گیاه میخک است (۵). گیاه گل میخک اثرات آرام‌کنندگی و

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: shahriari_b@yahoo.com

تسکین درد دارد (۲۷). عصاره این گیاه برای بی‌هوشی برخی ماهیان در کشور استفاده گردیده در حالی که آرام‌بخشی آن هنوز بررسی نشده است. تنباکو *Nicotiana tabacum* برای ضدعفونی کردن سطح خارجی بدن انسان و حیوانات و نیز برطرف کردن انگل‌های حیوانی مصرف سنتی دارد (۹). ماده موثر موجود در تنباکو نیکوتین است که به میزان ۲ تا ۵ درصد در برگ خشک آن یافت می‌شود (۱۹). برخی بررسی‌ها نشان می‌دهد گیاه تنباکو یک داروی بی‌هوشی موثر و مطلوب برای ماهی است (۸). تریکائین متان سولفونات Tricain Methan Sulfonate (MS222) پرمصرف‌ترین و رایج‌ترین داروی بی‌هوشی ماهی است و برای القای سریع بی‌هوشی عمیق، بسیار مؤثر است (۲۱). این دارو مشتق بنزوکائین است که از طریق آبشش‌ها و در برخی گونه‌ها از طریق پوست جذب می‌شود. در کبد و احتمالاً کلیه دچار تغییر زیستی می‌گردد. در درجه اول از طریق آبشش‌ها پاک و با متابولیت‌های اضافی در ادرار و صفرا دفع می‌شود. MS222 می‌تواند با هیپوکسمی در ماهی همراه شود و حاشیه امنیتی آن به ویژه برای ماهیان جوان در آب‌های گرم و شیرین کمتر است (۱۸). با توجه به محدودیت‌ها و عوارض استفاده از MS222، یافتن داروهای جایگزین با هدف آرام‌بخشی در ماهی ضروری به نظر می‌رسد.

تا به حال اثر آرام‌بخشی (حمام طولانی مدت با مقادیر کمتر از دوز بی‌هوشی) عصاره آبی گل میخک و تنباکو در ایران و جهان بررسی نشده است. به طور کلی هدف از این پژوهش مطالعه تغییرات برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی از جمله فعالیت آنزیم‌های سرمی، پروتئین تام و کورتیزول و گلوکز در ماهی کپور معمولی به هنگام در معرض قرار گرفتن ماهی با پودر گل میخک، پودر تنباکو و تریکائین متان سولفونات Tricain Methan Sulfonate (MS222) است.

مواد و روش کار

تعداد ۲۱۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزن ۶۴/۶۰±۸/۰۴ گرم از مزرعه پرورش ماهی واقع در ملاثانی صید شد و به آکواریوم‌های ۱۰۰ لیتری منتقل گردید. برای سازش با شرایط آزمایشگاه، ماهیان یک هفته پیش از شروع کار در محیط آزمایشگاه نگه‌داری شدند. در طول نگه‌داری ماهی‌ها فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب برای همه گروه‌ها یکسان بود. غذادهی ماهی‌ها به‌طور روزانه (روزانه ۲٪ وزن بدن با غذای تجاری بیومار) انجام شد و در طی دوره آرام‌بخشی، غذادهی انجام نگرفت.

به منظور تعیین غلظت مورد استفاده عصاره‌ها ابتدا در پژوهشی اولیه، غلظت بی‌هوشی بر اساس منابع، در نظر گرفته شد (۶ و ۸)؛ سپس دوز آرام‌بخشی به میزان ۲۰ و ۴۰ درصد غلظت توصیه شده، تعیین گردید.

نهایتاً ماهی‌ها به ۶ تیمار ۱۰ تایی (با ۳ تکرار) تقسیم شدند. یک گروه هم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و در آکواریوم‌هایی به حجم ۱۰۰ لیتر انتقال یافتند. تیمارها به شکل زیر انجام شد:

تیمار ۱: افزودن عصاره خام گل میخک ۲۰ mg/l (۲۰٪ غلظت توصیه شده برای بی‌هوشی) به طور روزانه به مدت ۲ روز متوالی

تیمار ۲: افزودن عصاره خام گل میخک ۴۰ mg/l (۴۰٪ غلظت توصیه شده برای بی‌هوشی) به طور روزانه به مدت ۲ روز متوالی

تیمار ۳: افزودن عصاره خام تنباکو ۴۰ mg/l (۲۰٪ غلظت توصیه شده برای بی‌هوشی) به طور روزانه به مدت ۲ روز متوالی

تیمار ۴: افزودن عصاره خام تنباکو ۸۰ mg/l (۴۰٪ غلظت توصیه شده برای بی‌هوشی) به طور روزانه به مدت ۲ روز متوالی

تیمار ۵: افزودن داروی تریکائین متان سولفونات ۲۰ mg/l (۲۰٪ غلظت توصیه شده برای بی‌هوشی) به طور روزانه به مدت ۲ روز متوالی

تیمار ۶: افزودن داروی تریکائین متان سولفونات ۴۰ mg/l (۴۰٪ غلظت توصیه شده برای بی‌هوشی) به طور روزانه به مدت ۲ روز متوالی.

در گروه شاهد هیچ‌گونه دارویی به آکواریوم افزوده نشد.

برای تهیه غلظت مورد نظر، ابتدا حجم آکواریوم بر حسب لیتر و با تناسب میزان کل دارو محاسبه شد؛ سپس با وزن کردن پودر گیاه خشک و حل کردن آن در حدود ۱ لیتر آب از خود آکواریوم، محلول به دست آمده به آرامی به آکواریوم حاوی ماهی اضافه گردید. برای تهیه عصاره خام ابتدا تنباکو و گل میخک مورد نیاز به صورت خشک شده به مدت ۲ دقیقه در آسیاب خرد شد. پودر به دست آمده پس از عبور دادن از الک ۵۰۰ تا ۷۰۰ میکرونی، با ترازوی دقیق وزن و برای مصرف آماده شد. به منظور تهیه عصاره آبی مقادیر مورد نظر از پودر الک شده در آب خیسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه کنار گذاشته شد و مداوم به هم زده شد تا سوسپانسیون حاصل در آب حل شود (۷). نمونه برداری از ماهیان در ۳ نوبت (به ترتیب ۲، ۴ و ۶ روز پس از اضافه کردن عصاره به آکواریوم) صورت گرفت و هر بار ۱۰ قطعه از ماهی‌ها به طور تصادفی انتخاب و برای انجام آزمایش‌ها استفاده شدند. ماهیان قبل از نمونه‌برداری با فنوکسی اتانول بی‌هوش شده و خون‌گیری از ساقه دمی ماهی‌ها همراه با هپارین انجام گرفت. هماتوکریت در همان روز اندازه‌گیری شد و سپس پلاسما به منظور بررسی فراسنجه‌های بیوشیمیایی جداسازی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

مقادیر پروتیین تام به روش بیوره، گلوکز به روش آنزیمی گلوکز اکسیداز و فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و کراتین‌کیناز (CPK) به روش کالریمتریک با کیت‌های تشخیصی شرکت پارس آزمون و دستگاه اتوآنالایزر بیوشیمیایی (BT-1500 Auto analyzer, Italy) اندازه‌گیری شد؛ همچنین میزان هورمون کورتیزول نیز با کیت کورتیزول (Monobind Inc, CA, USA) به روش الایزا اندازه‌گیری شد.

برای آنالیز آماری و بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین فراسنجه‌های بیوشیمیایی تیمارهای مورد مطالعه از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تکمیلی LSD در سطح معنی‌دار P< ۰/۰۵استفاده شد.

نتایج

مقادیر حاصل از اندازه‌گیری میزان فعالیت سرمی آنزیم‌های ALP، AST، ALT و CPK در جدول ۱ درج شده است. در مقایسه بین گروهی هر کدام از فراسنجه‌ها میزان فعالیت آنزیم ALP در دو تیمار عصاره میخک و دو تیمار عصاره تنباکو نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (P< ۰/۰۵). میزان فعالیت آنزیم CPK در تیمار تریکائین متان سولفونات (۲۰mg/l) و دو تیمار عصاره میخک و دو تیمار عصاره تنباکو نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (P< ۰/۰۵). میزان فعالیت آنزیم AST در تیمار تنباکو (۴۰mg/l) نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد و همچنین میزان فعالیت آنزیم ALT در گروه شاهد با هیچ‌کدام از گروه‌های دیگر اختلاف معنی‌داری نشان نداد.

مقادیر پروتئین تام سرم در جدول ۲ ارائه شده است. در مقایسه بین گروهی مقادیر اندازه‌گیری شده پروتئین تام تیمار عصاره میخک (۴۰mg/l) و دو تیمار عصاره تنباکو نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد (P< ۰/۰۵).

مقادیر کورتیزول و گلوکز سرم در جدول ۲ درج شده است. مقایسه بین گروهی صورت گرفته نشان داد که مقادیر اندازه‌گیری شده کورتیزول در گروه شاهد با هیچ‌کدام از گروه ها اختلاف معنی‌داری نداشت و در مورد

گلوکز تیمار تریکائین متان سولفونات (۲۰mg/l) و دو تیمار عصاره گل میخک و تیمار عصاره تنباکو (۸۰mg/l) با گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵).

جدول ۱- میانگین ± انحراف معیار میزان فعالیت آنزیم‌های ALP، AST، ALT و CPK در گروه‌های مورد بررسی

گروه	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	CPK (U/L)
شاهد	۸۸/۴۵ ±۱۱/۵۴[a]	۲۲۰/۴۴±۱۷/۳۹[a]	۳/۰۷±۰/۸۴[a]	۲۴۸/۸۳±۸۵/۴[a]
تریکائین متان سولفونات (۲۰ mg/l)	۹۴/۳۵± ۹/۸۶ [a]	۲۳۳/۴۶±۱۷/۶۲[a]	۴/۲۱±۰/۹۹[a]	۶۰۴/۶۲±۶۶/۸[b]
تریکائین متان سولفونات (۴۰ mg/l)	۷۴/۶۴±۵/۸۷[a]	۱۸۴/۲۵±۲۰/۶۳[a]	۵/۱۷±۱/۲۱[a]	۳۷۲/۸±۵۵/۹۴[a]
عصاره میخک (۲۰ mg/l)	۱۹۸/۷۶±۲۵/۷۶[b]	۱۹۲/۸۰±۱۴/۷۷[a]	۲/۱۶±۰/۶۵[a]	۵۵۶±۶۷/۱۲[b]
عصاره میخک (۴۰ mg/l)	۱۴۸/۰۷±۱۲/۱۵[b]	۱۸۹±۱۴/۸۲[a]	۲/۶۱±۰/۴۷[a]	۵۸۱/۴۹±۹۲/۶[b]
عصاره تنباکو (۴۰ mg/l)	۱۶۷/۳۱±۱۲/۹۵[b]	۱۷۱/۳۱±۱۷/۵۶[b]	۲/۷۵±۰/۵۲[a]	۶۵۱/۶۳±۱۰۱/۴۶[b]
عصاره تنباکو (۸۰ mg/l)	۱۶۸/۵±۱۹/۲۴[b]	۱۷۶/۶۸±۱۱/۰۵[a]	۲/۲±۰/۳۲[a]	۵۴۵/۱۵±۹۸/۵[b]

حروف نامتشابه در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

جدول ۲- میانگین ± انحراف معیار میزان برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی در گروه‌های مورد بررسی

گروه	گلوکز (mg/dl)	کورتیزول (µg/dl)	پروتئین تام (g/dl)
شاهد	۹۰/۸۵±۴/۶۳[a]	۶/۵۴±۲/۶۲[a]	۳/۱۳±۰/۰۸[a]
تریکائین متان سولفونات (۲۰ mg/l)	۶۹/۲۱±۶/۵۲[b]	۵/۰۲±۰/۶۱[a]	۲/۸۶±۰/۱۵[a]
تریکائین متان سولفونات (۴۰ mg/l)	۸۷/۱۷±۱۰/۴۶[a]	۴/۴۱±۰/۸۶[a]	۲/۹۹±۰/۰۹[a]
عصاره میخک (۲۰ mg/l)	۶۲/۸۳±۴/۷۲[b]	۵/۳۳±۱/۴۸[a]	۲/۸۲±۰/۰۹[a]
عصاره میخک (۴۰ mg/l)	۶۲/۵۷±۵/۵۷[b]	۷/۵۳±۱/۴۷[a]	۲/۵۷±۰/۱۱[b]
عصاره تنباکو (۴۰ mg/l)	۷۶/۵۸±۶/۹۳[a]	۴/۳۷±۰/۸۸[a]	۲/۵۴±۰/۱[b]
عصاره تنباکو (۸۰ mg/l)	۶۳/۸۴±۴/۵۸[b]	۴/۸۴±۱/۰۵[a]	۲/۷۲±۰/۱۵[b]

حروف نامتشابه در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

بحث

پژوهش حاضر برای اولین بار به منظور بررسی اثر آرام‌بخشی عصاره گل میخک و تنباکو و تاثیر آن بر برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم ماهی کپور معمولی صورت گرفته است.

طبق نتایج به دست آمده میزان فعالیت آنزیم ALP در دو تیمار عصاره میخک و دو تیمار عصاره تنباکو نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). با توجه به این که این آنزیم به عنوان یک ابزار تشخیصی برای ارزیابی عملکرد کبد و آسیب شناسی آن محسوب می‌شود افزایش فعالیت ALP سرم می‌تواند بیانگر کولستاز و اختلال در عملکرد ترشحی هپاتوسیت‌ها باشد (۱۰ و ۱۴). از سویی آنزیم ALP موجود در کبد نقش مهمی در متابولیسم گلیکوژن ایفا و سنتز گلیکوژن را در کبد تحریک می‌کند. تحریک و افزایش تولید این آنزیم در کبد با تجزیه گلیکوژن برای تأمین انرژی مورد نیاز تحت شرایط استرس‌زا در ارتباط است (۲۶)؛ بنابراین می‌توان افزایش فعالیت آنزیم ALP در مطالعه حاضر در تیمارهای عصاره میخک و عصاره تنباکو را تا حدودی به اثرات این دو ترکیب بر عمل‌کرد ترشحی کبد نسبت داد (۱۷)؛ با این وجود، بررسی مقادیر اندازه‌گیری شده ALT نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در گروه شاهد با هیچ‌کدام

از گروه‌های دیگر اختلاف معنی‌داری ندارد. قسمت عمده این آنزیم در داخل سلول‌های کبدی و در میتوکندری هپاتوسیت‌ها قراردارد بنابراین هر گونه آسیب خفیف، التهاب یا نکروز سلول‌های کبد موجب آزاد شدن این آنزیم‌ها و افزایش سطح آن در پلاسما می‌گردد (۱۵)؛ همچنین در بررسی نتایج حاصل از سنجش میزان فعالیت آنزیم AST در مطالعه حاضر، به جز کاهش در تیمار تنباکو (۴۰mg/l) تغییر معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم در تیمارهای مختلف نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد. افزایش AST در نکروز سلولی بیشتر بافت‌ها، از جمله عضلات قلبی و اسکلتی و نیز پارانشیم کبد دیده می‌شود (۲۸)؛ بنابراین با توجه به عدم تغییر در فعالیت آنزیم‌های ALT و AST پلاسما در تیمارهای مختلف، می‌توان چنین نتیجه گرفت که غلظت‌های استفاده شده از عصاره تنباکو و عصاره گل میخک در این مطالعه به بافت‌های یاد شده به‌ویژه هپاتوسیت‌ها آسیبی وارد نکرده است. میزان فعالیت آنزیم CPK در تیمار تریکائین متان سولفونات (۲۰mg/l) و دو تیمار عصاره میخک و دو تیمار عصاره تنباکو نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت. آنزیم CPK در ماهیچه‌های اسکلتی، قلب، آبشش، مغز و دیگر بافت‌های ماهی یافت می‌شود و افزایش سطح این آنزیم می‌تواند به دلیل آسیب‌های وارده به غشاهای زیستی سلول‌ها و آزاد شدن این آنزیم‌ها باشد (۴).

در سایر پژوهش‌های انجام شده روی عصاره‌های گیاهی برای بی‌هوشی یا آرام‌بخشی ماهی، نیز نتایج مشابهی حاصل شده است، از جمله در بررسی که سلطانی و همکاران در سال ۱۳۸۱ در مورد اثر بی‌هوشی با اسانس گل میخک هندی با غلظت ppm ۱۰۰ و ۲۰۰ (یک و دو برابر غلظت توصیه شده برای ایجاد بی‌هوشی) روی آنزیم‌های خون کپور معمولی انجام دادند، اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم ALP، AST و ALT مشاهده نگردید؛ همچنین در پژوهشی که Velisek و همکاران در سال ۲۰۰۵ برای بررسی اثرات بی‌هوشی عصاره گل میخک روی ماهی کپور معمولی انجام دادند، استفاده از این عصاره تغییر معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های AST، CPK و ALT ایجاد نکرد. در پژوهشی که Adamu در سال ۲۰۰۹ در مورد اثر تحت کشنده پودر برگ تنباکو بر فعالیت‌های آنزیمی Heteroclarias انجام داد تفاوت ناچیزی در میزان فعالیت آنزیم‌های ALP، AST و ALT نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید؛ همچنین در پژوهشی که Feng و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی اثر بی‌هوشی با MS-222 (در غلظت‌های mg/l ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰ و ۱۶۰) و روغن میخک (در غلظت‌های mg/l ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰) بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهی خاویاری سیبری *Acipenser baerii* نابالغ انجام دادند، مشاهده گردید که روغن میخک اثرات معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم ALP و ALT نداشته است.

میزان اندازه‌گیری شده پروتئین تام در تیمار عصاره میخک (۴۰mg/l) و دو تیمار عصاره تنباکو نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار داشت ($P<0/05$). همان‌گونه که Jrueger و همکاران در سال ۱۹۶۸ گزارش کرده‌اند ماهی می‌تواند انرژی خود را از طریق کاتابولیسم پروتئین‌ها به دست آورد. با وجود این که کبد نقش مهمی در سنتز پروتئین‌های پلاسما دارد، با توجه به عدم تغییر در آنزیم‌های نشطی کبد (ترانس آمینازها)، کاهش سطح پروتئین پلاسما در پژوهش حاضر را احتمالا می‌توان با کاهش جذب و یا از دست رفتن پروتئین ناشی از عصاره‌های گیاهی مرتبط دانست. در پژوهش‌های مختلف نتایج متفاوتی در این خصوص حاصل شده است. در بررسی که Velisek و همکاران در سال ۲۰۰۵ روی اثر بی‌هوشی دهنده عصاره گل میخک روی کپور معمولی انجام دادند اختلاف معنی‌داری در مقادیر اندازه‌گیری شده پروتئین تام مشاهده نشد. با این وجود در بررسی که Omoniyi و همکاران در سال ۲۰۰۲ بر روی اثر غلظت کشنده و تحت کشنده عصاره برگ تنباکو روی وزن و

تغییرات هماتولوژی *Clarias gariepinus* انجام دادند، مشاهده کردند که مقادیر اندازه‌گیری شده پروتئین تام نسبت به گروه شاهد با افزایش غلظت عصاره تنباکو کاهش می‌یابد که از این نظر با پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد؛ همچنین در پژوهشی که Adamu و Kori-Siakpere در سال ۲۰۱۱ در مورد اثرات تحت کشنده غلظت‌های برگ تنباکو بر برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی Hybrid Catfish انجام دادند کاهش معنی‌داری در پروتئین تام سرم مشاهده گردید.

از کورتیزول می‌توان به عنوان یکی از شاخص‌های نشان دهنده میزان استرس استفاده کرد (۲۳). کورتیزول با تحریک پدیده‌های گلیکولیز و تبدیل اسید لاکتیک به گلوکز در کبد طی پروسه شیمیایی از منابع پروتئین و چربی، موجب افزایش گلوکز سرم خون می‌گردد. تحت شرایط استرس ACTH مترشحه از هیپوتالاموس به قسمت قدامی کلیه وارد و با تحریک سلول‌های بین کلیوی سبب ترشح کورتیزول و در نهایت موجب افزایش میزان کورتیزول موجود در خون می‌شود (۲). در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری از نظر میزان کورتیزول پلاسما بین هیچ‌یک از گروه‌های تیمار با گروه شاهد مشاهده نگردید؛ بنابراین احتمالاً می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که اثر عصاره‌های میخک و تنباکو در غلظت‌های مورد استفاده از نظر آرام‌بخشی و ممانعت از استرس مشابه تریکائین متان سولفونات بوده است. در پژوهشی که بابایی نژاد و همکاران در سال ۱۳۹۲ در مورد بررسی اثرات دو ماده بی‌هوشی لیدوکائین، سدیم بیکربنات و ماده‌ی بی‌هوشی گیاهی عصاره گل میخک بر فراسنجه‌های خون و میزان هورمون کورتیزول در مولدین نر ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* دریای مازندران انجام دادند، مشاهده گردید که میزان هورمون کورتیزول در نمونه عصاره گل میخک نسبت به نمونه شاهد تفاوت معنی‌دار نداشته است. در پژوهشی که Inoue و همکاران در سال ۲۰۰۵، روی اثر روغن میخک روی پاسخ به استرس در Matrinxa در حین حمل و نقل، انجام دادند، مشاهده شد که روغن میخک میزان کورتیزول پلاسما را کاهش داده است.

در این مطالعه میزان گلوکز اندازه‌گیری شده تیمار تریکائین متان سولفونات (۲۰mg/l) و دو تیمار عصاره گل میخک و تیمار عصاره تنباکو (۸۰mg/l) در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان دادند ($P<0/05$). در پژوهشی که Omoniyi و همکاران در سال ۲۰۰۲ روی اثر غلظت کشنده و تحت کشنده عصاره برگ تنباکو روی وزن و تغییرات هماتولوژی *Clarias gariepinus* انجام دادند، مشاهده گردید که مقادیر اندازه‌گیری شده گلوکز نسبت به گروه کنترل با افزایش غلظت عصاره تنباکو کاهش یافته است. در پژوهشی که Inoue و همکاران در سال ۲۰۰۵، روی اثر روغن میخک روی پاسخ به استرس در Matrinxa در حین حمل و نقل، انجام دادند مشاهده گردید که روغن میخک میزان گلوکز را کاهش داده است. در شرایط پر استرس (داخلی یا خارجی) سلول‌های کرومافین هورمون‌های کتکول آمین، آدرنالین و نورآدرنالین را به درون خون آزاد می‌کنند (۲۵). هورمون‌های استرس با تحریک کورتیزول و بالابردن سطح تولید گلوکز در ماهی از طریق مسیرهای گلوکونئوژنز و گلیکوژنولیز (۲۱)، برای مقابله با تقاضای انرژی تولید شده به وسیله عوامل استرس‌زا، ارتباط دارند. این تولید گلوکز عمدتا با عملکرد کورتیزول در تحریک گلوکونئوژنز کبد و همچنین توقف جذب قند محیطی انجام می‌شود (۳۰)؛ در نتیجه کاهش گلوکز در پژوهش حاضر بیانگر این است که این عصاره‌ها می‌توانند به عنوان آرام‌بخش مؤثر باشند.

در مجموع می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که اگرچه استفاده از عصاره میخک یا تنباکو در غلظت‌های مورد مطالعه، موجب ایجاد افزایش در فعالیت برخی آنزیم‌های سرمی می‌گردد، اما از نظر کیفیت آرام‌بخشی تفاوتی با تریکائین متان سولفونات ندارد. برای ارزیابی ابعاد مختلف

اثرات این دو عصاره بر سلامت ماهی پژوهش‌های وسیع تری مورد نیاز است.

منابع

۱- بابایی‌نژاد، لیلا؛ بحر کاظمی، معصومه؛ سعیدی، علی اصغر و خان زمانی محمدی، مهدی؛ بررسی اثرات دو ماده بی‌هوشی لیدوکائین، سدیم بیکربنات و ماده بی‌هوشی گیاهی عصاره گل میخک بر پارامترهای خون و میزان هورمون کورتیزول در مولدین نر ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) دریای مازندران؛ فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری؛ ۱۳۹۲؛ ۲: ۱۱-۲۲.

۲- تاتینا، مصطفی؛ طاعتی، رضا؛ بهمنی، محمود؛ سلطانی، مهدی و قریب‌خانی، مهتاب؛ اثر استرس حاد بر نوسانات کورتیزول و گلوکز ماهیان استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) تغذیه شده با سطوح متفاوت ویتامین‌های E و C؛ مجله آبزیان و شیلات؛ ۱۳۹۰؛ ۸: ۹-۱۹.

۳- زرگری، علی؛ گیاهان دارویی؛ چاپ سوم؛ انتشارات دانشگاه تهران؛۱۳۶۰؛ جلد اول؛ صفحه ۶۵۶، ۶۵۴، ۶۵۳.

۴- زارع، هما؛ نوری، احمد؛ یوسف‌زادی، مرتضی و بنایی، مهدی؛ تأثیر غلظت‌های زیر کشنده شیرابه فرفیون ترکمنی (*Euphorbia turcomanica*) بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی کبد ماهی آفانیوس گورخری (*Aphanius dispar*)؛ مجله علمی شیلات ایران؛ ۱۳۹۳؛ ۴: ۳۱-۴۸.

۵- ظریف کار، اسداله؛ اسکندریان، حسین؛ مختاری، مختار و جعفر، آی؛ ارزیابی اثرات ضد درد اوژنول استفاده از تست فرمالین در موش صحرایی؛ مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی؛ ۱۳۸۲؛ ۱: ۶۱-۶۷.

۶- سلطانی، مهدی؛ غفاری، مصطفی؛ خضرایی‌نیا، پروانه و بکایی، سعید؛ مطالعه اثرات بی‌هوشی اسانس گل میخک هندی بر پارامترهای هماتولوژیک برخی آنزیم‌های خون و آسیب‌شناسی بافت‌های مختلف ماهی کپور معمولی؛ مجله تحقیقات دامپزشکی؛ ۱۳۸۳؛ ۳: ۲۹۵-۲۹۹.

۷- شریف‌پور، عیسی؛ سلطانی، مهدی؛ عبدالحی، حسین و قیومی، راضیه؛ اثر بی‌هوش‌کنندگی اسانس گل میخک (*Eugenia caryophyllata*) در شرایط مختلف pH و درجه حرارت در بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)؛ مجله علمی شیلات ایران؛ ۱۳۸۱؛ ۴ : ۵۹-۷۴.

۸- ضرغام، داود؛ شریف روحانی، مصطفی؛ فلاحت ناصرآباد، عیسی و باشتی، طیبه؛ بررسی اثر بی‌هوش‌کنندگی عصاره‌های آبی و الکلی تنباکو (*Nicotiana tabacum*) بر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)؛ مجله علمی شیلات ایران؛ ۱۳۹۱؛ ۴: ۳۳-۴۰.

۹- معاونی، پیام؛ گیاهان دارویی؛ چاپ اول؛ انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس؛ ۱۳۸۸؛ جلد اول؛ صفحه ۵۷۹-۵۸۰.

۱۰- مجابی، علی؛ نظیفی حبیب‌آبادی، سعید و صافی، شهاب‌الدین؛ بیوشیمی درمانگاهی دامپزشکی؛ چاپ دوم؛ انتشارات نوربخش؛۱۳۹۰؛ صفحه ۹۵.

۱۱- مختاری، مختار؛ شریعتی، مهرداد و آذرنوش، ژاله؛ تأثیر داروی کابرگولین بر میزن آنزیم‌های کبدی و پروتئین‌های سرم در موش صحرایی نر؛ مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد؛ ۱۳۸۹؛ ۴: ۴۵-۵۰.

12- Adamu, K. M.; Sublethal effects of tobacco (Nicotiana Tobaccum) leaf dust on enzymatic activities of Heteroclarias (a Hybrid of Heterobranchus Bidorsalis and Clarias Gariepinus). Jordan J. Biol. Sci; 2009; 2: 151-158.

13- Adamu, K. M. and Kori-Siakpere, O.; Effects of sublethal concentrations of

tobacco (Nicotiana Tobaccum) leaf dust on some biochemical parameters of hybrid catfish (Clarias gariepinus and Heterobranchus Bidorsalis). Braz. Arch. Biol. Technol; 2011; 54(1): 183-196.

14- Agrahari, S. and Gopal, K.; Fluctuations of certain biochemical constituents and markers enzymes as a consequence of monocrotophos toxicity in the edible freshwater fish, Channa punctatus. Pest. Biochem. Physiol; 2009; 94: 5-9.

15- Banaee, M; Mirvagefei, A; Rafei, G. and Majazi Amiri, B; Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. Int. J. Environ. Res; 2008; 2: 189-198.

16. Feng, G. P; Zhuang, L; Zhang, B; Kynard, X; Shi, M; Duan, J; Liu, J. and Huang, X; Effect of anaesthetics MS-222 and clove oil on blood biochemical parameters of juvenile Siberian sturgeon (Acipenser baerii). J. Appl. Ichthyol; 2011; 27(2): 595-599.

17- Gande, T. M; Racicot, J. G. and Leray, C; Enzyme activities of plasma and selected tissues in Rainbow trout Salmo gairdeir richardson. J. Fish. Biol; 1975; 7: 505-512.

18- Harms, C. A; Anesthesia in fish. In: Fowler, M. E. and Miller, R. E. (eds). Zoo and wild animal medicine, current therapy 4. WB Saunders, Philadelphia; 1999; pp: 158-163.

19- Hassal, K. A; The chemistry of pesticides. Macmillan press, London, UK; 1982; p: 32.

20- Inoue, L. A. K. A; Afonso, L. O. B; George K; Iwama, G. K. and Moraes, G; Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (Brycon cephalus) subjected to transport. Acta Amaz.; 2005; 35(2): 289-295.

21- Iwama, G. K; Vijayan, M. M; Forsyth, R. B. and Ackerman, P. A; Heat shock proteins and physiological stress in fish. Am. Zool; 1999; 39: 901-909.

22- Jrueger, H. W; Saddler, J. B; Chapman, G. A; Tinsely, I. J. and Lowry, R. R; Bioenergetics, exercise and fatty acids of fish. Am. Zool.; 1968; 8: 119.

23- Martinez-Porchas, M; Martinez-Cordova, L. R. and Enriquez, R; Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress. Pan-Am. J. Aquat. Sci.; 2009; 4: 158-178.

24- Omoniyi, I; Agbon, A. O; Sodunke S. A; Effect of lethal and sub lethal concentration of tobacco (nicotiana tobaccum) leaf dust extract on weight and hematological changes in clarias gariepinus. J. Appl. Sci. Environ. Manage; 2002; 6: 37-41.

25- Reid, S. G; Bernier, N. J; Perry, S. F; The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol; 1998; 120: 1-27.

26- Saha, S. and Kaviraj, A; Effects of cypermethrin on some biochemical parameters and its amelioration through dietary supplementation of ascorbic acid in freshwater catfish Heteropneustes fossilis. Chemosphere; 2009; 74: 1254-1259.

27- Soto, C. G. and Burhanuddin, C; Clove oil as a fish anesthetic for measuring length and weight of rabbit fish (Siguanus

lineatus). Aquaculture; 1995; 136: 149-152.

28- Srivastava, A. S; Oohara, I; Suzuki, T; Shenouda, S; Singh, S. N; Chauhan, D. P. and Carrier, E; Purification and properties of cytosolic alanine aminotransferase from the liver of two freshwater fish, Clarias batrachus and Labeo rohita. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol; 2004; 137: 197-207.

29- Velisek, J; Svobodova, Z; Piackova, V; Groch L. and Nepejchalova, L; Effect of clove oil anaesthesia on common carp. Vet. Med. Czech; 2005; 50: 269-275.

30- Wedemeyer, G. A; Barton, B. A. and McLeay, D. J; Stress and acclimation. In: Schreck C. B, Moyle P. B. (eds). Methods for Fish Biology. MD: American Fisheries Society, Bethesda; 1990; pp: 491-527.

31- Yin, Z; Lam, T. J. and Sin. Y. M; The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp. Fish Shellfish Immunol; 1995; 5: 519-529.

Evaluation of clove and tobacco extract and tricaine methane sulfonate (MS222) sedation on some of serum enzymes and biochemical parameters in common carp

Shahryarizadeh, B.[1*]; Peyghan, R.[2]; Jalali, S. M.[3]; Fatemi Tabatabaee, S.R.[4]

1. D.V.M. Graduted Student, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran.
2. Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran.
3. Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran.
4. Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran.

Received: 5 January 2017 ***Accepted:*** 16 January 2018

Summary

In this study sedative effect of clove extract and tobacco extract and MS222 on some of serum biochemical parameters of common carp was studied. Two hundred ten fish were divided into 7 groups (two concentrations of clove extract 20 and 40 mg/l, two concentrations of Tobacco extract 40 and 80 mg/l and two concentrations of MS222, 20 and 40 mg/l for 2 days and one group considered as control). Each group had 10 fish with 3 replicates. At days 2, 4 and 6 after sedation blood sampling was done and some biochemical parameters including: total protein, glucose, cortisol and activities of serum enzymes AST, ALT, CPK and ALP were measured in plasma. According to results no significant differences in ALT and cortisol were seen between different experimental groups. The AST level in 40 mg/l tobacco extract group decreased significantly ($P<0.05$) in comparison with control group. ALP level in the clove extract groups and tobacco extract groups increased significantly ($P<0.05$) in comparison with control group. The level of total protein was decreased significantly by clove extract (40 mg/l) and tobacco extracts ($P<0.05$). The level of glucose in MS222 group (20 mg/l), clove extract groups and one of tobacco extract groups (80 mg/l) decreased significantly ($p<0.05$) in comparison with the control group. Although the use of clove or tobacco extracts at concentrations studied, made an increase in the activity of some serum enzymes, but there was no difference in the quality of sedation when compared with MS222.

Keywords: Sedation effect, Clove extract, Tobacco extract, Common carp.

* Corresponding Author E-mail: shahriari_b@yahoo.com