

بررسی اثر حمام تخم‌ها با مالاشیت گرین در ایجاد ناهنجاری و تغییرات ظاهری در لاروهای ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)

رحیم بیغان، مهرزاد مصباح، عبدالرحمن راسخ* و مهدی محمدی ده‌چشمه

گروه علوم درمانگاهی - دانشگاه شهید چمران اهواز و

*گروه آمار - دانشگاه شهید چمران اهواز

پست الکترونیکی: rpeyghan@yahoo.com

چکیده

از آن جا که گزارشات متعددی در ارتباط با اثرات مسمومیت‌زا، موتاژن، تراتوژن و کارسینوژن مالاشیت گرین وجود دارد، لذا در این تحقیق اثرات این ماده در ایجاد ناهنجاری‌های لاروهای ماهی کپور نقره‌ای بررسی شده است. به این منظور ۵ گروه ۳۰۰ تایی از تخم‌های ماهی کپور نقره‌ای انتخاب گردید و دو بار (به فاصله ۱۰ ساعت) هر بار به مدت یک ساعت در معرض غلظت‌های مختلف مالاشیت گرین (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده شدند. یک گروه مشابه نیز به عنوان شاهد (بدون حمام مالاشیت گرین) در نظر گرفته شد. پس از طی شدن دوره انکوباسیون تخم‌ها و تخم‌کشایی، لاروها تا مرحله انگشت قد نگهداری شده و ناهنجاری‌های آن‌ها بررسی شد. ضایعات مشاهده شده در بچه ماهیان در این تحقیق عبارتند از: خونریزی در اندام‌های مختلف از جمله کلیه‌ها، محوطه بطنی، باله‌ها، عضلات و ساقه دمی، بدشکلی ستون مهره‌ها، عدم جذب کامل کیسه زرده، کاهش وزن، طول و رشد نوزادان بود. در بررسی آماری ضایعات مشخص گردید که درصد ماهیان واجد خونریزی در محوطه بطنی، عضلات، ساقه دمی و کلیه‌ها در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهند. جذب ناقص کیسه زرده که تنها در گروه‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر دیده شد که موارد بروز آن در دو گروه ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های دیگر داشته است. در این تحقیق هیچ رابطه معنی‌داری بین مالاشیت گرین و میزان بدشکلی ستون مهره‌ها مشاهده نگردید. با افزایش غلظت مالاشیت گرین تعداد بچه ماهیانی که حداقل یک ضایعه را نشان می‌دادند به جز در گروه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به شکل معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P < 0/05$). کاهش طول و وزن بچه ماهیان نیز در گروه‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با شاهد معنی‌دار می‌باشد ($P < 0/05$).

واژه های کلیدی: مالاشیت گرین، لارو، ناهنجاری، کپور نقره‌ای، تخم ماهی.

مقدمه

یکی از مؤثرترین ترکیبات ضد قارچی مورد استفاده در مراکز تکثیر، مالاشیت گرین^۱ است. مالاشیت گرین نخستین بار در سال ۱۹۳۶ در صنایع شیلات و آبی پروری مورد استفاده قرار گرفت [۱]. تا پیش از آن، از این ماده به عنوان رنگ بیشتر در صنایع چرم، کاغذسازی و نساجی استفاده می‌شد. از زمان استفاده از مالاشیت گرین در آبی پروری تاکنون تحقیقات گسترده‌ای در مورد میزان مالاشیت گرین مورد نیاز در درمان بیماری‌های قارچی و انگلی ماهی صورت گرفته است به نحوی که هم اکنون از این ماده به طور متداول جهت درمان و پیشگیری عفونت‌های قارچی و انگلی ماهیان مولد، ماهیان آکواریومی، لاروها و تخم‌ها استفاده می‌شود. امروزه علی‌رغم این که در برخی کشورها استفاده از این ماده در ماهیانی که به مصرف خوراکی می‌رسند مجاز نیست با این حال به دلیل عدم جایگزینی توسط داروی مناسب دیگر هنوز استفاده از آن در بسیاری از کشورها تحت شرایط خاص متداول است. تحقیقات متعددی در ارتباط با اثرات مختلف سمی و سوء مالاشیت گرین در ماهی انجام شده است [۲، ۳، ۴ و ۵]. مالاشیت گرین به عنوان یک ماده شیمیایی که ایجاد موتاسیون می‌کند (موتاژن) شناخته شده است [۶ و ۷]. این ماده همچنین می‌تواند موجب اختلالاتی نظیر شکستگی و به هم چسبیدگی کروموزوم‌ها شود و نیز به عنوان یک ماده تراوتوزن عمل کند [۵ و ۸]. مالاشیت گرین چه برای ماهیان و چه برای موجودات دیگر به عنوان

یک کارسینوژن و سرطان‌زا نیز شناخته شده است. در حیوانات آزمایشگاهی همانند موش خرما مصرف این ماده باعث بروز جهش‌های ژنی و ایجاد نسل‌های سلول سرطانی گشته است [۹]. در ماهیان نیز مالاشیت گرین به عنوان یک ماده تراوتوزن معرفی گردیده است که اثرات سوء آن در برخی ماهیان به اثبات رسیده است [۵ و ۱۰].

مالاشیت گرین در جنین یک نوع هامستر موجب ترانسفورماسیون بدخیم سلولی و ایجاد تومور گردیده است [۱۱]. همچنین مالاشیت گرین به عنوان کارسینوژن در تبدیل ضایعات کبد موش خرما به تومورهای بدخیم مؤثر بوده است و به عنوان محرک ایجاد تومور نیز شناخته شده است [۱۲].

در حال حاضر از مالاشیت گرین برای درمان بسیاری از انگل‌های خارجی و عفونت‌های قارچی بچه ماهیان و ماهیان آکواریومی استفاده می‌شود. اخیراً مشخص شده است این ماده بر روی تک یاخته‌های داخلی نیز مؤثر است [۱۳]. اگر چه از این ماده جهت ضد عفونی تخم‌ها و لاروهای ماهیان، خصوصاً ماهی قزل‌آلا به طور وسیعی استفاده می‌گردد ولی به عنوان یک داروی مجاز و مورد تأیید FDA^۲ نیست.

در مورد اثر این ماده در دوران جنینی ماهی‌ها خصوصاً قزل‌آلا تحقیقات زیادی صورت گرفته است با این حال در ماهیان گرم آبی و کپور ماهیان تحقیقات کمتری انجام شده است. شاید علت این امر دوران کوتاه انکوباسیون تخم‌های کپور ماهیان

وزنی و شمارش آزمایشی مشخص گردید که هر ۳ گرم تخم معادل ۱۰۰ عدد تخم می‌باشد. لذا به میزان ۹ گرم معادل ۳۰۰ عدد تخم توزین و به ۶ ظرف انکوباسیون ۱۰ لیتری منتقل شد.

حمام تخم‌ها با مالاشیت گرین

تخم‌ها دو بار متوالی به فاصله ۱۰ ساعت و هر بار به مدت یک ساعت در معرض مالاشیت گرین (Malachite green Oxalate, Zinc free. Merck. Germany) با غلظت‌های مختلف (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. در تمامی مدت درمان، آب ورودی ویس‌ها قطع شده و از طریق اتصالاتی که از قبل با استفاده از لوله‌های باریک آکواریومی و سنگ‌های هوا آماده گردیده بود، اکسیژن‌دهی به منظور تأمین اکسیژن مورد نیاز تخم‌ها و معلق نگه داشتن آن‌ها انجام گرفت. ضمناً در یکی از گروه‌ها به عنوان کنترل هیچ غلظتی از مالاشیت گرین استفاده نگردید.

با پایان یافتن مدت درمان یک ساعته جریان آب ورودی ویس‌ها مجدداً برقرار گردید تا آب درون ویس تعویض شود. برای این کار، جریان آب را افزایش داده تا آب حاوی دارو سریع‌تر تعویض گردد و برای جلوگیری از خروج تخم‌ها، تورهای مخصوصی روی ویس‌ها قرار داده شد.

نگهداری و تغذیه لاروها پس از تفریح

لاروها در مدت زمانی حدود ۳۶-۳۰ ساعت از تخم خارج شدند. پس از آن با گذشت حدود ۴۸ ساعت،

باشد. در این تحقیق سعی شده است اثرات این ماده با استفاده از آن در مرحله جنینی ماهی که حساس‌ترین مرحله نسبت به مواد سرطان‌زا است، مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

تکثیر نیمه مصنوعی ماهی‌ها

از تعداد دو جفت مولد نر و ماده ماهی کپور نقره‌ای در مرکز تکثیر و پرورش شهید ملکی اهواز تخم‌گیری به عمل آمد. برای این کار همزمان با افزایش تدریجی دمای آب، به مولدین ماده رسیده، در دو نوبت به فاصله ۸-۶ ساعت عصاره هیپوفیز (۳ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن ماهی) جهت القای تخم‌ریزی تزریق گردید. مولدین نر نیز همزمان با تزریق مرحله دوم مولدین ماده و به میزان نصف مولدین ماده تزریق گردیدند. در فاصله بین دو تزریق، مولدین نر و ماده در حوضچه‌های آرامش به طور جداگانه نگهداری شدند. پس از تزریق نهایی، مولدین نر و ماده به حوضچه‌های گرد مخصوص تخم‌ریزی انتقال یافته و تحت تأثیر هورمون تزریق شده و جریان آب روان حوضچه‌های گرد، تخم‌ریزی انجام گردید. مولدین نر نیز اسپرم را روی تخم‌ها رها کرده و تخم‌های لقاح یافته از راه یک توری ریزچشم به سبد جمع‌آوری تخم‌ها انتقال یافتند.

جمع‌آوری و شمارش تخم‌ها

در مرحله بعد تخم‌های جمع‌آوری شده پس از شمارش به ظروف انکوباسیون تخم‌ها (ویس) منتقل شدند. جهت شمارش تخم‌ها با استفاده از روش

دمی) و وزن ماهی اندازه‌گیری شده سپس آسیب‌ها و ضایعات احتمالی آن‌ها زیر لوپ آزمایشگاهی بررسی گردیدند.

بررسی آماری

به منظور بررسی چگونگی و میزان تأثیر غلظت‌های مختلف مالاشیت گرین روی وزن و طول بچه ماهیان از آنالیز رگرسیونی استفاده گردید. برای مقایسه میانگین طول و وزن بچه ماهیان در غلظت‌های مختلف، روش آنالیز واریانس یک طرفه^۲ و آزمون مقایسه‌ای توکی^۳ با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS به کار گرفته شد.

نتایج

الف: ضایعات ظاهری مشاهده شده در بدن بچه ماهیان به طور کلی در بررسی ضایعات با استریومیکروسکوپ ضایعات مشاهده شده شامل: خونریزی در ساقه دمی، باله‌ها، کلیه‌ها، عضلات و محوطه بطنی، رشد ناقص و خمیدگی در ستون مهره‌ها بود که نوع و درصد ضایعات ظاهری در غلظت‌های مختلف حمام با مالاشیت گرین و درصد کل ضایعات در نمودار ۱ و ۲ نشان داده شده است. نکته دیگری که در بچه ماهیان مشاهده شد رشد ناقص برخی از آن‌ها بود که به منظور راحتی ثبت نتایج و تفسیر آن‌ها سه وضعیت برای رشد بچه ماهیان در نظر گرفته شد (جدول ۱).

با جذب بیش از نیمی از کیسه زرده و آغاز شنای فعال لاروها در سطح ویس‌ها، تغذیه دستی آغاز گردید. برای این کار شیرابه‌ای، تهیه شده از زرده تخم‌مرغ آب‌پز سفت شده هر ۲ تا ۳ ساعت یکبار به لاروها داده می‌شد.

سه روز پس از خروج لاروها از تخم، لاروها به آکواریوم‌ها منتقل شدند. آکواریوم‌ها از قبل جهت ورود بچه ماهیان شسته و آبگیری شده بود. در این جا از آب لوله‌کشی شهری با دمای تقریباً ۲۴-۲۳ درجه استفاده شد و به منظور کلرزدایی حدود ۲۴ ساعت قبل از انتقال بچه ماهیان آبگیری آکواریوم‌ها صورت گرفته بود و برای اطمینان بیشتر از تیوسولفات سدیم خالص^۱ به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ لیتر آب به منظور کلرزدایی استفاده شد. در هر یک از آکواریوم‌ها نیز ۲۸ لیتر آب در نظر گرفته شد. قبل از ورود لاروها به درون آکواریوم‌ها به منظور جلوگیری از شوک ناشی از اختلاف دما، بیش از یک ساعت هم دمایی صورت گرفت. تغذیه لاروها در این زمان نیز توسط زرده تخم‌مرغ، شیر خشک و غذای زنده ادامه یافت و تا ۲۰ روز پس از خروج از تخم ادامه داده شد.

بررسی رشد و ضایعات ماهی‌ها

در روز بیستم پس از خروج از تخم، شمارش نهایی و بیومتری آن‌ها آغاز گردید. بچه ماهیان توسط توری صید شده و پس از آرام شدن توسط لیدوکائین ۲ درصد به میزان (۴۰ mg/l) و خشک کردن پوست با کاغذ صافی، طول کل (از نوک پوزه تا انتهای باله

2- One way analysis of variance

3- Tukey test

1- Na₂S₂O₅·5H₂O Merck Germany

جدول ۱- وضعیت رشد بچه ماهیان در گروه‌های مختلف درمانی

گروه‌های مختلف درمانی	وضعیت رشد به درصد		
	C	B	A
کنترل	-	-	۱۰۰
۰/۱	-	-	۱۰۰
۰/۲	-	-	۱۰۰
۰/۵	۱/۶۳	۸/۱۹	۹۰/۱۸
۱	۲۶/۸۲	۳۹/۰۲	۳۴/۱۴
۲	۷۵/۸۶	۲۴/۱۴	-

بچه ماهیان از رشد خوبی برخوردار بودند (وضعیت A، جدول ۱).

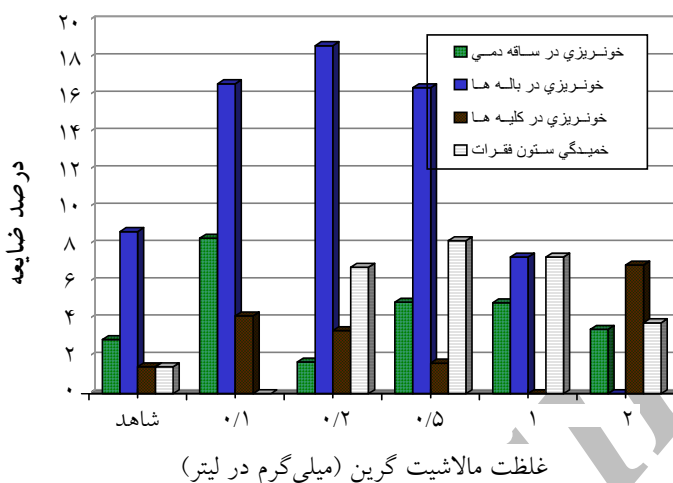
گروه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر: ضایعات مشاهده شده این گروه عبارتند از: ۸/۳۳ درصد خونریزی در ساقه دم، ۱۶/۶۶ درصد خونریزی در باله‌ها، ۴/۱۶ درصد خونریزی در کلیه‌ها، ۱/۳۸ درصد خونریزی در عضلات و ۲/۷۷ درصد خونریزی در محوطه بطنی بود. در هیچ یک از بچه ماهیان خمیدگی ستون مهره‌ها مشاهده نگردید. ۱۸/۰۵ درصد از بچه ماهیان این گروه نیز حداقل یک ضایعه را نشان می‌دادند. وضعیت رشد تمامی بچه ماهیان نیز نرمال و طبیعی بود (وضعیت A، جدول ۱).

گروه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر: در این گروه ۱/۶۹ درصد از بچه ماهیان خونریزی در ساقه دم، ۱۸/۶۴ درصد خونریزی در باله‌ها، ۳/۳۸ درصد خونریزی در کلیه‌ها، ۱/۶۹ درصد خونریزی در عضلات و ۶/۷۷ درصد خمیدگی در ستون مهره‌ها را نشان می‌دادند. ۲۵/۴۲ درصد بچه ماهیان نیز حداقل واجد یک ضایعه بودند (جدول ۲).

گروه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر: ۴/۹ درصد از بچه ماهیان این گروه خونریزی در ساقه دم، ۱۶/۳۹ درصد خونریزی در باله‌ها، ۱/۶۳ درصد خونریزی در کلیه‌ها، ۱/۶۳ درصد خونریزی در محوطه بطنی، ۱/۶۳ درصد عدم جذب کامل کیسه زرده و ۸/۱۹ درصد خمیدگی در ستون مهره‌ها را نشان می‌دادند. مجموع ماهیانی که حداقل واجد یک ضایعه بودند نیز ۳۱/۱۴ درصد بود (نمودار ۱).

وضعیت A: رشد بدنی در این گروه طبیعی بود و باله‌ها و دستگاه‌های مختلف بدن رشد کافی داشتند. وضعیت B: در این گروه نیز اندام‌های داخلی سیر تکاملی طبیعی خود را طی کرده بودند ولی رشد بدنی خصوصاً باله‌ها به اندازه گروه قبلی نبود. وضعیت C: در این گروه علاوه بر عدم رشد اندام‌های سطحی نظیر باله‌ها، اندام‌های داخلی مانند کلیه‌ها نیز رشد کافی نداشتند. کلیه‌ها و محوطه بطنی کوچک بودند. کیسه شتا به خوبی از گاز پر نشده و کیسه زرده نیز به طور کامل جذب نشده بود.

گروه شاهد: در بررسی‌های به عمل آمده، در ۲/۸۹ درصد بچه ماهیان این گروه خونریزی در ساقه دم، ۸/۶۸ درصد خونریزی در باله‌ها، ۱/۴۴ درصد خونریزی در کلیه‌ها، ۱/۴۴ درصد خمیدگی ستون مهره‌ها دیده شد. درصد بچه ماهیانی که حداقل یک ضایعه را نشان می‌دادند نیز ۱۱/۵۹ درصد بود. تمامی



نمودار ۱- نوع و درصد ضایعات ظاهری در غلظت‌های مختلف حمام ملاشیت گرین

جدول ۲- نوع و درصد ضایعات در گروه‌های مختلف بچه ماهیان درمان شده

کل ضایعات	گروه‌های تحت درمان										نوع ضایعه			
	۲ میلی گرم در لیتر		۱ میلی گرم در لیتر		۰/۵ میلی گرم در لیتر		۰/۲ میلی گرم در لیتر		۰/۱ میلی گرم در لیتر		شاهد		تعداد	درصد
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد		
۴/۵۳	۳/۴۴	۱	۴/۸۷	۲	۴/۹	۳	۱/۶۹	۱	۸/۳۳	۶	۲/۸۹	۲	۱	خونریزی در ساقه دم
۱۲/۶۸	۰	۰	۷/۳۱	۳	۱۶/۳۹	۱۰	۱۸/۶۴	۱۱	۱۶/۶۶	۱۲	۸/۶۸	۶	۲	خونریزی در باله‌ها
۰/۶	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱/۶۹	۱	۱/۳۸	۱	۰	۰	۳	خونریزی در عضلات
۲/۷۱	۶/۸۹	۲	۰	۰	۱/۶۳	۱	۳/۳۸	۲	۴/۱۶	۳	۱/۴۴	۱	۴	خونریزی در کلیه‌ها
۱/۵۱	۰	۰	۴/۸۷	۲	۱/۶۳	۱	۰	۰	۲/۷۷	۲	۰	۰	۵	خونریزی در محوطه بطنی
۵/۱۳	۳/۷۹	۴	۷/۳۱	۳	۸/۱۹	۵	۶/۷۷	۴	۰	۰	۱/۴۴	۱	۶	خمیدگی ستون فقرات
۱۰/۲۷	۷۵/۸۶	۲۲	۲۶/۸۲	۱۱	۱/۶۳	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۷	عدم جذب کامل کیسه زرده
۲۸/۳۹	۷۹/۳۱	۲۳	۳۹/۰۲	۱۶	۳۱/۱۴	۱۹	۲۵/۴۲	۱۵	۱۸/۰۵	۱۳	۱۱/۵۹	۸	۸	مجموع ماهیان* ضایعه‌دار
۱۸/۴۲	۱۰۰	۲۹	۶۵/۸۵	۲۷	۸/۱۹	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۹	عدم رشد کافی**

*بچه ماهیانی که حداقل یک ضایعه را نشان می‌دهند.

**این پارامتر در مجموع کل ضایعات هر گروه محاسبه نشده است چون اغلب بچه ماهیان این پارامتر از نظر بدنی کامل هستند و تنها رشد کمی دارند.

است ($P > 0.05$). در مورد خونریزی در ساقهٔ دمی نیز نتیجهٔ حاصله تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان نمی‌دهد ($P > 0.05$). در صد ماهیان واجد خونریزی در کلیه‌ها نیز در هیچ یک از گروه‌های درمانی با گروه شاهد تفاوتی معنی‌داری ندارد ($P > 0.05$). البته همان طوری که در جدول ۲ دیده می‌شود، در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر افزایشی در میزان خونریزی در کلیه‌ها وجود دارد ولی این افزایش نیز به سطح معنی‌داری نمی‌رسد. در بررسی‌های انجام شده بر روی نتایج خونریزی در محوطهٔ بطنی که تنها در گروه‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر دیده شده بودند نیز اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد وجود ندارد ($P > 0.05$) و تأثیر مالاشیت گرین با غلظت‌های به کار رفته در این رابطه، در گروه‌های مختلف یکسان است.

اثرات استفاده از غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر مالاشیت گرین بر روی عدم جذب کامل کیسهٔ زرده نیز بین گروه شاهد و این گروه‌ها معنی‌دار نیست ($P > 0.05$) ولی استفاده از مالاشیت گرین با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش معنی‌دار عدم جذب کامل کیسه زرده در بچه ماهیان این گروه‌ها گردیده است ($P > 0.05$). استفاده یا عدم استفاده از مالاشیت گرین با غلظت‌های به کار رفته در این تحقیق به جز غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر اثر یکسانی بر روی خونریزی در باله‌های بچه ماهیان داشته است ($P > 0.05$). البته در سه گروه نخست یعنی گروه‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر میزان خونریزی در باله‌ها بیش از سایر

گروه ۱ میلی‌گرم در لیتر: نتایج به دست آمده در این گروه عبارتند از: ۴/۸۷ درصد خونریزی در ساقه دمی، ۷/۳۱ درصد خونریزی در باله‌ها، ۴/۸۷ درصد خونریزی در محوطهٔ بطنی، ۷/۳۱ درصد خمیدگی در ستون مهره‌ها و ۲۶/۸۲ درصد عدم جذب کامل کیسهٔ زرده بود. در این گروه ۶۵/۸۵ درصد ماهیان واجد نقصان در رشد بدنی (وضعیت B) بودند. مجموع ماهیانی که حداقل واجد یک ضایعه بودند نیز ۳۹/۰۲ درصد بوده است^۱ (جدول ۲). گروه ۲ میلی‌گرم در لیتر: در این گروه ۳/۴۴ درصد خونریزی در ساقه دمی، ۶/۸۹ درصد خونریزی در کلیه‌ها، ۱۳/۷۹ خمیدگی در ستون مهره‌ها و ۷۵/۸۶ درصد عدم جذب کامل کیسهٔ زرده مشاهده گردید. از ۲۹ بچه ماهی شمارش شده در این گروه همگی واجد نقصان رشد (وضعیت‌های B و C) بودند. میزان بچه ماهیان واجد حداقل یک ضایعه نیز ۷۹/۳۱ درصد بود (جدول ۲).

نتایج بررسی آماری ضایعات مشاهده شده در بچه ماهیان به روش تعیین آماره نرمال استاندارد نشان می‌دهد که در اغلب موارد گروه‌های مختلف درمانی اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشته‌اند. به عبارت دیگر مالاشیت گرین تأثیر معنی‌داری در افزایش یا کاهش این دسته از ضایعات نداشته است. به طور مثال: در بررسی میزان خمیدگی ستون مهره‌ها افزایش درصد لاروهای واجد خمیدگی در ستون مهره‌ها در غلظت‌های مختلف درمانی معنی‌دار نبوده

۱- بچه ماهیانی که در وضعیت رشد B به سر می‌برند جزء مجموع ضایعه‌ها محاسبه نشده‌اند.

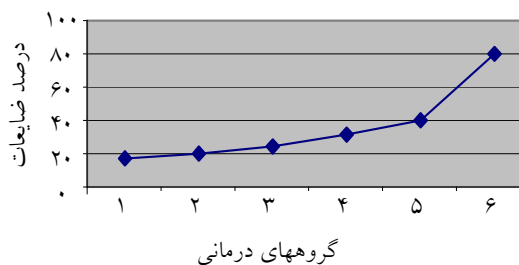
از اندازه‌گیری طول و وزن بچه ماهیان در جدول ۳ آمده است.

نتایج نشان می‌دهد با افزایش غلظت مالاثیت گرین در گروه‌های مختلف، وزن بچه ماهیان به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ($P < 0/05$). تنها در مقایسه غلظت‌های ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر استثناء وجود دارد به بیان دیگر بچه ماهیان در این غلظت‌ها با یکدیگر از نظر وزن اختلاف معنی‌داری ندارند و اثرات استفاده دارو در مورد وزن در این گروه‌ها یکسان بوده است ولی به طور کلی مالاثیت گرین باعث کاهش معنی‌داری وزن ماهیان مورد مطالعه (نسبت به گروه شاهد) شده است. همچنین در تمامی غلظت‌های استفاده شده به طور معنی‌داری طول بچه ماهیان نسبت به گروه شاهد کمتر است و اثرات آن در تمامی گروه‌ها نیز معنی‌داری بوده است ($P < 0/05$).

با توجه به نتایج مربوط به آنالیز رگرسیونی وزن، مالاثیت گرین تأثیر معنی‌داری بر روی وزن بچه ماهیان به جای گذشته است ($P < 0/05$). همچنین با افزایش غلظت، وزن بچه ماهیان نیز کاهش می‌یابد. آنالیز رگرسیونی مربوط به طول بچه ماهیان در غلظت‌های استفاده شده نیز نشان‌دهنده تأثیر معنی‌داری غلظت‌های مختلف مالاثیت گرین بر طول بچه ماهیان می‌باشد ($P < 0/05$) به نحوی که افزایش غلظت، با طول بچه ماهیان رابطه معکوس داشته است.

گروه‌هاست که البته باز هم به سطح معنی‌دار نمی‌رسد ($P > 0/05$).

در بررسی مجموع بچه ماهیانی که حداقل یک ضایعه را نشان می‌دهند به جز گروه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اختلاف بقیه گروه‌های دیگر با شاهد معنی‌دار بوده ($P < 0/05$) و مجموع ضایعات آن‌ها بیش از گروه شاهد بوده است. البته در گروه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نیز مجموع ماهیان ضایعه‌دار بیش از گروه شاهد است ولی این اختلاف معنی‌دار نیست ($P > 0/05$). به عبارت دیگر اثرات غلظت‌های ۰ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر مالاثیت گرین بر روی مجموع ماهیان ضایعه‌دار یکسان بوده است. البته ماهیان ضایعه‌دار در گروه‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر افزایش پیدا کرده‌اند ولی ماهیان ضایعه‌دار در گروه‌های ۵ و ۶ بیشتر بوده‌اند (نمودار ۲).



نمودار ۲- درصد ماهیان واجد ضایعه در گروه‌های مختلف مالاثیت گرین

ب: اثرات غلظت‌های استفاده شده مالاثیت گرین روی طول و وزن بچه ماهیان
غلظت‌های استفاده شده مالاثیت گرین اثرات مختلفی بر روی وزن و طول بچه ماهیان داشته و در برخی باعث کاهش وزن و طول گردید. نتایج حاصل

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار وزن و طول بچه ماهیان در گروه‌های مختلف

طول		وزن		تعداد بچه ماهی	گروه‌های درمان شده
انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین		
۰/۱۴۷۰	۱/۶۵۶۵	۰/۰۱۲۲	۰/۰۳۸۶	۶۹	صفر
۰/۱۲۰۶	۱/۵۶۹۴	۰/۰۰۸۶۲	۰/۰۳۲۵	۷۲	۰/۱ میلی گرم در لیتر
۰/۱۱۷۵	۱/۴۶۱۰	۰/۰۰۶۹۴	۰/۰۲۵۶	۵۹	۰/۲ میلی گرم در لیتر
۰/۰۸۹۲۳	۱/۳۶۵۶	۰/۰۱۹۶	۰/۰۲۳۱	۶۱	۰/۵ میلی گرم در لیتر
۰/۱۰۷۲	۱/۰۵۸۵	۰/۰۰۳۰۱	۰/۰۰۸۴۹	۴۱	۱ میلی گرم در لیتر
۰/۱۱۲۱	۰/۹۵۵۲	۰/۰۰۲۷۰	۰/۰۰۷۱۲	۲۹	۲ میلی گرم در لیتر

بحث

زخم ایجاد کند [۶]. البته این ماده واجد اثرات پاتولوژیک بر روی بافت‌های مختلف نیز می‌باشد [۱۵]. با این حال در مورد مالاشیت گرین و اثرات آن روی تخم و لاروهای کپور نقره‌ای تحقیقی صورت نگرفته است.

مجموع ضایعات در گروه شاهد با تمامی گروه‌ها به جز ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، دارای اختلاف معنی‌دار است. با افزایش غلظت دارو، به میزان مجموع ماهیان ضایعه‌دار نیز افزوده می‌گردد به طوری که اکثر ماهیان گروه‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر واجد حداقل یک ضایعه هستند. مهار آنزیم‌های تنفسی در مرحله انکوباسیون و جنینی ممکن است منجر به ایجاد نقص‌های مختلف بدنی گردد ضمن آن که عوارض و اثرات پاتولوژیک مالاشیت گرین نیز در این روند مؤثر است. از سوی دیگر لاروهای خارج شده که تحت استرس ناشی از مصرف دارو می‌باشند (مالاشیت گرین در این فاصله هنوز در بدن و بافت‌های مختلف لاروها وجود دارد) یا احیاناً

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که مالاشیت گرین باعث کاهش وزن، کاهش رشد و افزایش میزان ضایعات ظاهری می‌گردد. شاید عمده‌ترین و عینی‌ترین اثر مالاشیت گرین در ماهیان و آبزی‌پروری اثرات این ماده در مهار آنزیم‌های تنفسی تیول‌دار (SH) میتوکندری‌ها باشد که به همین علت از آن به عنوان یک سم تنفسی یاد می‌گردد که باعث بروز اختلالات تنفسی و خفگی در ماهیان می‌شود [۳ و ۴].

مالاشیت گرین قادر است بسیاری از آنزیم‌های بدن انسان و حیوانات آزمایشگاهی نظیر گلوکاتایون ترانسفراز، تیروئید پراکسیداز انسانی و DNA سنتتاز موش خرما را نیز مهار کند [۱۴]. مالاشیت گرین به عنوان یک محرک حساس کننده و سوزاننده پوست و غشاءهای مخاطی ماهیان، حیوانات آزمایشگاهی و انسان‌ها مطرح است که قادر است در لایه مخاطی پوست ماهیان خراشیدگی و

در بررسی جداگانه ضایعات در بسیاری موارد بین بروز ضایعات و مالاشیت گرین رابطه معنی داری دیده نشد و نمی توان بروز این موارد را با قاطعیت به مالاشیت گرین نسبت داد. به طور مثال خونریزی در محوطه بطنی، باله‌ها و ساقه دمی در غلظت‌های استفاده شده اختلاف معنی داری با گروه شاهد ندارد. بروز این موارد ممکن است بر اثر دستکاری و تورکشی بوده باشد.

خونریزی‌های کلیوی نیز با افزایش غلظت مالاشیت گرین در گروه‌های شش گانه (از صفر تا ۲ میلی گرم در لیتر) افزایش یا کاهش معنی داری نشان نمی دهد ولی در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر این ضایعه افزایش چشم‌گیری یافته است گرچه این افزایش معنی دار نیست ولی نشان دهنده ارتباطی بین خونریزی‌های کلیوی و افزایش غلظت مالاشیت گرین است چه بسا با افزایش غلظت به بیش از ۲ میلی گرم در لیتر بروز این ضایعه نیز معنی دار شود.

در سه غلظت ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر خونریزی در باله‌ها بیشتر از گروه‌های دیگر است حتی میزان این ضایعات در گروه شاهد نیز بیش از گروه‌های ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر است با این حال هیچ یک از این موارد معنی دار نیست. علت افزایش این ضایعه در غلظت‌های پائین تر ممکن است با رشد بهتر و کامل تر باله‌ها و بیشتر شدن امکان ایجاد ضایعه در زمان تورکشی، جابجایی و کار با بچه ماهیان در ارتباط باشد در حالی که در گروه‌های ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر اصولاً باله‌ها از رشد بسیار کمی برخوردار بوده‌اند.

واجد نقص‌های آنزیمی یا بدنی هستند، توانایی تغذیه و رشد کمی خواهند داشت. چنانچه در عمل نیز دیده شد که در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر لاروها حتی از جذب کامل کیسه زرده نیز ناتوان بوده‌اند و رشد بسیار کمی نسبت به سایرین دارند. کاهش رشد، عدم توانایی تغذیه مناسب و نقایص به جامانده از دوران جنینی باعث گردیده که بچه ماهیان ضایعه‌دار که از مرحله جنینی به سلامت عبور کرده‌اند در مرحله لاروی و جذب کیسه زرده تلف گردند. البته وجود این ضایعات احتمال بروز بیماری‌های ثانویه را نیز افزایش می دهد که ممکن است عامل مرگ برخی لاروها و بچه ماهیان بوده باشد. علاوه بر این توانایی‌های مالاشیت گرین در تخریب ژنوم سلول‌های پیکری را نیز نباید از یاد برد که ممکن است باعث مرگ با تأخیر لاروها در مراحل بعد از انکوباسیون شده باشد.

مجموع این مسائل می تواند بیانگر تفاوت میان غلظت‌های استفاده شده باشد با آن که در برخی موارد اختلاف شاهد تنها با گروه‌های ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر معنی دار است ولی افزایش تعداد ماهیان ضایعه‌دار و تلفات، متناسب با افزایش غلظت، می تواند بیانگر این باشد که در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر مشکلات و ضایعات ایجاد شده گرچه سبب مرگ سریع جنین‌ها (همانند آن چه در مورد گروه‌های ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر اتفاق افتاده) نشده، ولی به مرور زمان باعث تلف شدن احتمالی بچه ماهیان و لاروها گردیده است و تلفات این سه گروه به عکس دو گروه ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر با تأخیر بوده است.

نتایج به طور کلی به یک مسمومیت جنینی نسبت داده شد [۵].

در این تحقیق نیز اختلاف معنی‌داری بین این خمیدگی‌ها و غلظت‌های مالاشیت گرین مشاهده نشد و نمی‌توان بین غلظت‌های به کار رفته مالاشیت گرین و این ضایعات رابطه معنی‌داری برقرار کرد. ممکن است این ضایعات پراکنده نیز ناشی از مسمومیت جنینی یا مکانیسم‌های دیگر باشد که به تحقیقات وسیع‌تری نیاز دارد.

مالاشیت گرین در گروه‌های مختلف باعث ایجاد نقصان رشد و کاهش وزن و رشد طولی گردیده است به طور کلی وزن تمام گروه‌ها نسبت به شاهد از کاهش معنی‌داری برخوردار بوده است که می‌تواند یک نکته منفی در استفاده از مالاشیت گرین حتی با غلظت‌های پائین مانند ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تلقی گردد. در مورد طول نیز همین وضعیت کم و بیش مشاهده می‌شود و طول متوسط ماهیان گروه شاهد که هیچ دارویی دریافت نکرده بودند از بقیه گروه‌ها بیشتر است این اثرات می‌تواند به عواملی همچون استرسی ناشی از مصرف مالاشیت گرین، ضایعات وارد شده به قسمت‌های مختلف بدن، افزایش احتمال ابتلا به بیماری‌های مختلف و عوامل دیگر مربوط باشد. البته با توجه به شرایط کاملاً مشابه نگهداری بچه ماهیان (شرایط آکواریوم) احتمال وجود عوامل استرس‌زا در برخی گروه‌ها به حداقل رسانده شده بود.

میزان مالاشیت گرین در تخم قزل‌آلا پس از استفاده تا ۳۱ روز در سطح بالا باقی می‌ماند و سپس شروع به کاهش تدریجی می‌نماید [۱۶]. با توجه به

عدم جذب کامل کیسه زرده که تنها در سه گروه ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر دیده شده است با افزایش غلظت از ۰/۵ به ۱ میلی‌گرم در لیتر و از ۱ به ۲ میلی‌گرم در لیتر افزایش چشم‌گیر و معنی‌داری می‌یابد در حالی که در گروه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تنها ۱/۶۳ درصد از ماهیان موفق به جذب کیسه زرده خود نشده‌اند. این میزان در گروه‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۲۶/۸۲ و ۷۵/۸۶ درصد است. که نشان دهنده ارتباط این ضایعه با مقدار مصرفی مالاشیت گرین است. استرس در لاروها و نقایص ایجاد شده ممکن است توانایی تغذیه را کاهش داده و منجر به عدم جذب کامل کیسه زرده گردیده باشد. خونریزی در قسمت‌های مختلف به خصوص در قسمت‌های سطحی می‌تواند ناشی از توانایی مالاشیت گرین در ایجاد ضایعات، تحریک و دیگر ضایعات پاتولوژیک در سلول‌های عروق خونی باشد که پیشتر این ضایعات توسط گراندو [۱۵] نیز به طول کامل‌تر مورد بحث قرار گرفته است.

مالاشیت گرین به عنوان ماده‌ای کارسینوژن، تراژوژن و موتاژن مطرح شده است البته این تأثیرات مربوط به متابولیت‌های پایه آن از جمله آریل آمین اولیه می‌باشد. در تحقیقات انجام شده، اثرات تراژوژنیک مالاشیت گرین بر روی تخم‌های قزل‌آلا نیز قبلاً بررسی شده و مشخص گردیده است که میزان بدشکلی و خمیدگی‌های ستون مهره‌ها در لاروها و بچه ماهیان به وجود آمده از تخم‌هایی که با مالاشیت گرین درمان شده بودند افزایش می‌یابد ولی رابطه معنی‌داری بین این خمیدگی‌ها و مالاشیت گرین و غلظت‌های مختلف آن وجود نداشت و این

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری معاونت محترم آبریان شیلات خوزستان، مسئولین و کارکنان محترم گارگاه تکثیر و پرورش ماهی شهید ملکی اهواز که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند کمال سپاس را داریم.

مراجع

- [1] Foster, F.J. and Woodbury, L., The use of malachite green as a fish fungicide and antiseptic. *Progressive Fish Culturist*, 18 (1936) 7-9.
- [2] Bills, TD and Hunn, JB. Changes in blood chemistry of coho salmon exposed to malachite green. *Progressive Fish Culturist*, 38 (1976) 214 – 216.
- [3] Alderman, D.J., Malachite green: a review. *Journal of Fish Diseases*, 8 (1985) 89-298.
- [4] Alderman, D.J. and Clifton-Hadley, R.S., Malachite green: a pharmacokinetic study in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 16 (1993) 297-311.
- [5] Meyer, F.P. and Jorgenson, T.A., Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. *Transaction*

این امر می‌توان گفت که گرچه استفاده از مالاشیت گرین در دوران جنینی صورت گرفته ولی نمی‌توان اثرات این ماده و متابولیت‌های آن را که بعضاً خطرناک‌تر هستند، خاتمه یافته تلقی کرد. این مسئله می‌تواند باعث یک استرس طولانی مدت در بچه ماهیان و لاروها گردد که باعث کاهش تغذیه، رشد، وزن و طول می‌گردد.

با توجه به تمامی موارد ذکر شده می‌توان چنین نتیجه گرفت که اگر چه مالاشیت گرین با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش معنی‌دار در میزان خروج لارو از تخم بازماندگی نهایی پس از نگهداری در آکواریوم‌ها (حدود ۲۰ روز) نمی‌گردد با این حال با توجه به افزایش میزان کل ضایعات و ماهیان ضایعه‌دار که در تمامی گروه‌ها به جز گروه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌داری نسبت به عدم استفاده از مالاشیت گرین (گروه شاهد) نشان می‌دهند و نیز با توجه به این که با افزایش غلظت در تمامی گروه‌ها حتی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر با کاهش وزن و رشد لاروها مواجه هستیم توصیه می‌گردد حتی‌الامکان از مالاشیت گرین جهت درمان تخم‌های کپور نقره‌ای استفاده نشود و این ماده، با داروی مناسب دیگری جایگزین گردد. در صورتی که مجبور به استفاده از مالاشیت گرین باشیم، هرچه غلظت کمتری استفاده شود، ضایعات ایجاد شده و تأثیر سوء آن بر رشد لاروها و درصد خروج آنها از تخم کمتر خواهد بود.

- Hilfswissenschaften, 10 (1961) 745-771.
- [11] Mahudawala, D.M., Redkar, A.A., Wagh, A., Gladstone, B. and Rao, K.V., Malignant transformation of Syrian hamster embryo (SHE) cells in culture by malachite green: an agent of environmental importance. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37, 9 (1999) 904-918.
- [12] Sundarajan, M. Fernandis, A.B., Subrahmanyam, G., Prabhadesai, S., Krishnamurthy, S.C. and Rao, K.V., Over expression of G1/S cyclins and PCNA and their relationship to tyrosine phosphorylation and dephosphorylation during tumor promotion by metanill yellow and malachite green. *Toxicology Letters*, 116, 1-2 (2000) 119-130.
- [13] Alderman, D.J., Further thoughts on malachite green and PKD (proliferative kidney disease of trout). *Trout New*, 90 (1989) 6-8.
- [14] Doerge, D.R., Chang, H.C., Divi, R.L. and Churchell, M.T., Mechanism for inhibition of thyroid peroxidase by leucomalachite green. *Chemical Research of Toxicology*, 11 (1998) 1098-1104.
- of the American Fisheries Society, 112 (1983) 818-824.
- [6] Clemmensen, S., Toxicological studies on malachite green: a triphenylmethane dye. *Archive of Toxicology*, 58 (1984) 1. 43-45.
- [7] Fernandes, C., Lalitha, V.S. and Rao, K.V.K., Enhancing effect of malachite green on the development of hepatic preneoplastic lesion induced by N-nitrosodiethylamin in rat. *Carcinogenesis*, 12 (1991) 839-845.
- [8] Shwaiger, J., Worle, B., Wahl-Geiger, R. and Negele, R.D., Evaluation of genotoxic effects of malachite green oxalate by tow in vivo test using adult fish egg. *European Association of Fish Pathologists Seventh International Conference, Palmal De Mallorca, Spain. Abstracts Book*, (1995) 9.
- [9] Fessard, V. Godard, T., Huet, S., Mourrot, A. and Poul, J.M., Mutagenicity of malachite green and leucomalachite green in invitro tests. *Journal of Applied Toxicology*, 19, 6 (1999) 421-430.
- [10] Steffen, W., Leider, V., Nehring, D. and Hattop, H.W., Moglichkeiten and gefahren der anwendung von Makichitgrun in der Fisherei. *Zeitschrift fur Fisherei undren*

eggs and fry of rainbow trout, (Oncorhynchus mykiss, Walbaum), after treatments of eggs. Journal of Fish Disease, 18, 3 (1995) 239-247.

[15]Gerundo, N. Pathological effects of repeated doses of malachite green: a preliminary study. Journal of Fish Disease, 14 (1991) 521-532.

[16]Meinertz, J.R., Stehly, G.R., Gingerich, W.H. and Allen, J.L., Residues of (14C)- malachite green in

Archive of SID