اثر اسانس گل میخک (*Eugenia cairyophillata*) بارگذاری شده بر نانو ذرات آهن روی شاخص‌های آنزیمی و بافت‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مصطفی غفاری[1*]، علی خسروانی‌زاده[2]

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر اسانس گل میخک بارگذاری شده بر نانو ذرات آهن روی شاخصهای آنزیمی و بافت شناسی ماهی قزل آلای رنگین کمان می باشد. در بررسی حاضر ٦٤ عدد ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان با میانگین وزن ۲٤±۱۵۵/۸ در چهار گروه دسته بندی شدند. ۳ گروه از ماهیان با غلظت های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ قسمت در میلیون اسانس گل میخک بارگذاری بر نانوذرات آهن بیهوش شدند و گروه چهارم به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. زمان‌های رسیدن به مراحل مختلف بیهوشی اندازه‌گیری و ثبت شد. ماهیان پس از بیهوش شدن به تانک‌های جداگانه منتقل شده و در ساعات ۳ و ۲٤ پس از بیهوشی از گروه‌های مختلف به شیوه قطع ساقه دمی خون گیری به عمل آمد. پس از جدا نمودن سرم پلاسما توسط سانتریفیوژ، مقادیر آنزیم های آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) نمونه‌های پلاسما اندازه گیری شد. بافت‌های کلیه، کبد، طحال، مغز، آبشش و قلب ماهیان خونگیری شده نیز خارج و جهت بافت‌شناسی نگه داری گردید. نتایج نشان داد بیهوشی با غلظت های مختلف اسانس میخک بارگذاری شده بر نانوذرات آهن تغییرات معنی‌داری در میزان آنزیم های AST و ALT ندارد ($p<۰/۰۵$). همچنین بررسی میکروسکوپیک مقاطع تهیه شده از بافت‌های مختلف اثرات جانبی قابل توجهی نشان نداد. با توجه به این که دوز ppm ۱۰ مطالعه حداقل دوز مورد نیاز برای بیهوشی ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان تشخیص داده شد می توان بیان داشت حتی غلظت‌های ۵ برابر دوز توصیه شده نیز موجب آسیب بافتی در ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان نمی شود. نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان می دهد ایمنی و کارایی اسانس میخک با بارگذاری روی نانوذرات آهن به شکل معنی‌داری افزایش می یابد.

واژگان کلیدی: *اسانس گل میخک، نانو ذرات آهن، قزل‌آلای رنگین کمان، آمینوترانسفرازها، بیهوشی.*

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۱۹

مقدمه

بیهوشی یک ابزار ضروری در دامپزشکی آبزیان است. بیهوشی حتی برای انجام اعمالی مانند ضد عفونی جراحات پوستی و خونگیری که انجام آنها در دام‌های خونگرم نیازی به بیهوشی ندارد، مورد نیاز است(۹). مهمترین موارد کاربرد بیهوشی در ماهیان عبارتنداز: ضدعفونی جراحات سطحی، خون‌گیری، تخم‌کشی، حمل و نقل، بیوپسی، نمونه‌برداری و جراحی(۲۰و۱).

در سال‌های اخیر بسیاری از مواد بیهوش کننده تحت مطالعه دقیق قرار گرفته اند تا از نظر جنبه‌های اقتصادی و دامنه سلامتی طبقه‌بندی و در آبزی پروری مورد استفاده قرار گیرند(۵). یک داروی بیهوشی مناسب بایستی القای بیهوشی را به سرعت و با حداقل استرس ایجاد نماید، استفاده از آن به آسانی صورت پذیرد، بی‌حرکتی مطلوبی را ایجاد کند، موثر و مطمئن باشد و منجر به عدم تعادل بلند مدت و سایر مشکلات نشود، در دوزهای پایین موثر بوده، دوز موثر آن با دوز سمیت فاصله زیادی داشته باشد، برای فرد کاربر محرک و سمی نباشد، قابلیت حلالیت مطلوبی در آب داشته باشد و در غیر این صورت حلال های آن به مقدار کافی در دسترس و ارزان باشد، پایداری زیادی از نظر شمیایی داشته باشد و سریع فاسد نشود، بی دردی خوبی ایجاد کند، ارزان باشد و احیا ماهی از بیهوشی ایجاد شده توسط آن آسان و ایمن باشد، برای مصرف کننده گوشت ماهی بیهوش شده خطری نداشته باشد، به سرعت در محیط تجزیه شود و برای سایر موجودات زنده اکوسیستم غیرسمی باشد، اثرات تجمعی در اثر کاربرد مکرر آن ایجاد نگردد و سوخت و ساز سریعی در بدن ماهی داشته باشد (۲٦و ۷، ٦، ۵).

۱*- پژوهشکده تالاب بین المللی هامون، دانشگاه زابل، زابل،ایران. *Ghaffarimostafa@yahoo.com*

۲- دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

Archive of SID

www.SID.ir

سال‌هاست از اسانس گل میخک برای ایجاد بیهوشی در ماهیان استفاده می‌شود(۱). مطالعاتی که در خصوص اثرات جانبی اسانس گل میخک روی ماهیان انجام شده نشان داده اسانس گل میخک می‌تواند عوارض جانبی را در ماهیان تیمار شده با آن ایجاد نماید(۵، ۳٤ و ۳۵). لذا تلاش برای ساخت ترکیبات جدید با اثرات جانبی کمتر از این ماده مورد توجه قرار گرفته است.

دارورسانی کنترل شده در بدن از مقوله‌های بسیار مهم در صنعت دارو سازی است. در روش‌های معمول، دارو در سراسر بدن توزیع و تمام بخش‌های بدن تحت اثرات آن قرار خواهد گرفت و عوارض جانبی ایجاد خواهد کرد. لذا در مواردی باید مقادیر بیشتری از دارو تجویز شود. با فناوری نانو می توان به دارورسانی هدفمند دست یافت و زمان، مکان و سرعت آزادسازی دارو را کنترل نمود و ضمن کاهش عوارض جانبی، کارایی بالاتری را بدست آورد(۸). نانو ذرات آهن در صنعت، کشاورزی و پزشکی اهمیت بسیار زیادی دارند و می‌توانند کاربردهای بالقوه زیادی در فروسیال ها، تصویرسازی‌های رنگی، کاتالیست‌ها، ضبط کننده‌های مغناطیسی، سردسازی مغناطیسی، سم‌زدایی از سلول‌های بیولوژیکی، انتقال کنترل شده داروهای ضد سرطان و جداسازی‌های سلولی مغناطیسی داشته باشند (۱۸و ۱۳). در این مطالعه اسانس گل میخک بارگذاری شده بر نانو ذرات آهن با هدف کاهش عوارض جانبی در ماهیان در معرض قرار گرفته به کار گرفته شده است. در مطالعه حاضر برای ارزیابی میزان اثرات جانبی احتمالی اسانس گل میخک بارگذاری شده بر نانو ذرات آهن، آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) که در سال‌های اخیر به عنوان یکی از آزمایش‌ها رایج جهت تشخیص ایمنی داروهای بیهوشی تبدیل شده است (۳۵و ۳٤، ۳۳، ۳۲، ۵) و آزمایشات هیستوپاتولوژی مورد سنجش قرار گرفتند.

مواد و روش کار

۱) ماهی و شرایط ذخیره

تعداد ٦٤ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) ۲ ساله با میانگین وزنی ۲٤±۱۵۵/۸ گرم و میانگین طول۲±۲۳/۷ سانتیمتر به صورت تصادفی از مزرعه‌ای در شهر بنجار واقع در ٦/۵ کیلومتری جنوب شرقی شهرستان زابل با مختصات جغرافیایی ۳۱ درجه طولی و ٦۱ درجه عرضی صید و به سالن مدار بسته پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون دانشگاه زابل منتقل گردید. ماهیان به منظور سازگاری با شرایط محیطی جدید به مدت یک هفته در تانک‌های ۳۰۰ لیتری حاوی ۲۵۰ لیتر آب نگهداری شدند. نور سالن نور طبیعی شبانه روز بود. در طول مدت سازگاری و انجام آزمایش فاکتورهای فیزیکو شمیایی آب شامل درجه حرارت، pH، نیتریت، آمونیاک و دی اکسید کربن اندازه‌گیری و ثبت می‌گردید. به منظور تامین اکسیژن در حد اشباع هوادهی توسط پمپ هواده و سنگ هوا صورت می‌گرفت. در مدت سازگاری و انجام آزمایش ماهیان تغذیه نمی‌شدند، همچنین تانک‌ها روزانه سیفون می‌شدند و ۲۰ درصد آب آنها با آب تانک ذخیره تعویض می‌شد(٤).

۲) ماده بیهوشی

اسانس گل میخک (حاوی حداقل ۸۰٪ یوگنول) از غنچه‌های خشک شده درخت میخک (*Eugenia cairyophillata*) توسط پژوهشکده گیاهان دارویی تهیه و به منظور جلوگیری از تنزل نوری (Photodegradation) در ظرف تیره و دربسته و در دمای ۱۹ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه شیمی تجزیه دانشگاه زابل منتقل گردید. نانو ذرات آهن با استفاده از فرآیند ته نشینی شیمیایی تهیه شدند برای این منظور مخلوطی از کلرید آهن سه ظرفیتی (۲ گرم)، کلرید آهن دو ظرفیتی (۵/۲ گرم) و اسید هیدروکلریک ۱۲ مولار (۰/۸۵ میلی لیتر) در ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شدند. سپس مخلوط حاصل به صورت قطره قطره به ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول NaOH ۱/۵ مولار اضافه و به شدت هم

Archive of SID
www.SID.ir

زده شد. پس از انجام واکنش، نانو ذرات ته نشین شده بوسیله میدان مغناطیسی از مخلوط جدا شدند و پس از چهار بار شستشو با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به کمک آون خشک شدند. ۱/۵ گرم اسانس حل شده در مقدار کمی اتانول با ۵۰۰ میلی گرم از نانو ذرات آهن بدست آمده بارگذاری شد (۳۰و ١٤، ٤).

۳) گروه‌های آزمایش و بیهوشی

تعداد ٦٤ قطعه ماهی به صورت تصادفی در ٤ گروه ١٦ تایی تقسیم شدند و به تانک‌های جداگانه منتقل شدند. ۳ گروه با غلظت‌های ppm ۵۰، ppm ۲۵ و ppm ۱۰ اسانس گل میخک بار شده بر نانو ذرات آهن به شیوه حمام بیهوش شدند و گروه چهارم به عنوان گروه شاهد (بدون القا بیهوشی) در نظر گرفته شد. بیهوشی در آکواریوم ٦۰ لیتری محتوی ۳۰ لیتر محلول بیهوشی که از ترکیب آب و ماده بیهوشی در غلظت های ذکر شده بدست آمده بود صورت گرفت. سپس ماهیان بیهوش شده برای احیا به آکواریوم فاقد ماده بیهوشی منتقل شدند.

٤) بازگشت از بیهوشی و نمونه گیری

با رسیدن ماهی به مرحله بیهوشی سبک (مرحله‌ای که شامل علائمی مثل: از دست رفتن کامل تونیسیته عضلات، عدم پاسخ‌گویی به محرک‌های خارجی و ضربان قلب آهسته می‌باشد (۹)، ماهیان بیهوش شده برای بازگشت از بیهوشی با استفاده از ساچوک به آکواریومی دیگر حاوی ۵۰ لیتر آب فاقد ماده بیهوشی که به خوبی هوادهی می‌شد منتقل شدند. نیمی از ماهیان هر گروه بلافاصله پس از احیا و نیمی دیگر ٢٤ ساعت پس از بیهوشی خون‌گیری شدند و بافت‌های مغز، آبشش، کلیه، کبد، طحال و قلب آنها خارج و در بافر فسفات ۱۰٪ با pH= ۷/۲ ذخیره شدند.

۵) سنجش میزان آنزیم های AST و ALT

برای اندازه‌گیری میزان آنزیم AST و ALT از کیت‌های سنجش AST و ALT ساخت شرکت پارس آزمون استفاده شد. بر اساس دستورالعمل کیت پس از مخلوط کردن محلول‌های شماره یک و دو کیت ها به نسبت ٤ به یک با یکدیگر، ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل به ۱۰۰ میکرولیتر از سرم پلاسما اضافه شد و پس از هم زدن به کووت دستگاه اسپکتوفتومتر که از قبل در طول موج ۳٤۰ نانومتر با استفاده از کووت هوا صفر شده بود، منتقل گردید. کووت مورد نظر در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار گرفت و بلافاصله اندازه‌گیری زمان بوسیله کورنومتر آغاز شد. طول موج های بدست آمده در دقایق ۱، ۲ و ۳ ثبت شدند. برای محاسبه میزان فعالیت آنزیم، میانگین ۳ عدد بدست آمده در عدد ۱۹۸۵ ضرب شد تا میزان فعالیت آنزیم ها در واحد بین المللی بدست آید.

٦) بافت‌شناسی

فرآیند آبگیری با استفاده از الکل های ۷۰،۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد و به مدت ۱۲ ساعت صورت گرفت سپس به منظور شفاف سازی نمونه‌ها و خروج الکل از آنها به مدت ٤ ساعت نمونه‌ها در گزیلول قرار گرفتند. جهت نفوذ پارافین و ایجاد قوام مناسب برای غالب گیری در ۲ مرحله آغشته سازی به پارافین صورت پذیرفت و سپس نمونه‌ها در قالب‌های محتوی پارافین (پارافین جامدی که ٦۰ درجه حرارت دیده و مایع شده بود) غوطه ور شدند، پس از سرد شدن قالب ها به مدت ٤ ساعت در فریزر ۱۸- درجه سانتی گراد قرار داده شدند. با استفاده از میکروتوم (LEITZ مدل ۱۲۱۲) برش‌های ۵ میکرومتری تهیه گردید. برش‌های بدست آمده بر روی لام‌های شیشه‌ای چسبانده و پس از پارافین‌زدایی به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. بعد از خشک شدن برش‌های بدست آمده توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند(۳).

۷) آنالیز آماری

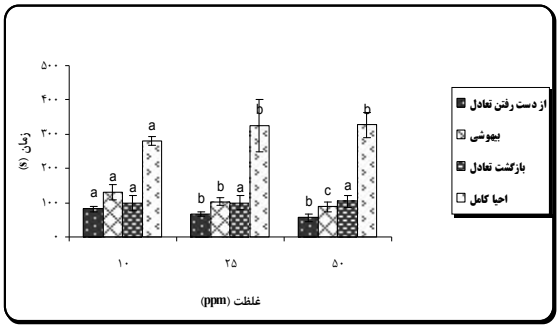
برای انجام محاسبات، آنالیزهای آماری (آنالیز واریانس یک طرفه) و ترسیم نمودارها از نرم افزارهای Microsoft Office Excell 2003 و SPSS14 استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

نتایج بدست آمده از بیهوشی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با غلظت های مختلف اسانس گل میخک بارگذاری شده روی نانو ذرات آهن و پارامترهای زمانی مختلف شامل مدت زمان لازم برای از دست رفتن تعادل ماهی، مدت زمان لازم برای ایجاد بیهوشی سبک در ماهی، مدت زمان لازم برای بازگشت تعادل ماهی و مدت زمان لازم برای احیاء کامل ماهی در نمودار۱ آمده، است بر اساس نتایج بدست آمده حداقل غلظت مورد نیاز جهت القا بیهوشی (حداقل غلظت مورد نیاز یک ماده بیهوشی: کمترین غلظتی است از ماده بیهوشی که بتواند ماهی را در کمتر از ۳ دقیقه بیهوش نماید و زمان احیا ماهی در آن غلظت ترجیحا کمتر از ۵ دقیقه باشد (Marking and Meyer, 1985)، در این گونه ۱۰ قسمت در میلیون تعیین گردید. در جدول ۱ مقادیر آنزیم‌های AST و ALT در گروه‌های مختلف بیهوشی و گروه شاهد در ساعات ۳ و ۲٤ پس از بیهوشی نشان داده شده است. سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های AST و ALT در ماهیان بیهوش شده با غلظت‌های مختلف اسانس گل میخک بارگذاری شده بر نانو ذرات آهن (۵۰، ۲۵ و ۱۰ قسمت در میلیون) و ماهیان گروه شاهد تغییرات معنی‌داری بین گروه‌های مختلف نشان نداد (**p<۰/۰۵**). همچنین بین میزان فعالیت آنزیم های AST و ALT ماهیان نمونه برداری شده در ساعات مختلف (۳ و ۲٤ پس از بیهوشی) تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد (**p<۰/۰۵**).



نمودار ۱: اثرات غلظت های مختلف اسانس گل میخک بارگذاری شده روی نانو ذرات آهن بر فرآیند بیهوشی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

مطالعه میکروسکوپیک مقاطع تهیه شده از بافت‌های قلب، کلیه، کبد، طحال، مغز و آبشش ماهیان بیهوش شده با اسانس گل میخک بارگذاری شده بر روی نانو ذرات آهن در غلظت های مختلف (۵۰، ۲۵، ۱۰ قسمت در میلیون) در ساعات ۳ و ۲٤ پس از بیهوشی هیچ گونه عارضه جانبی قابل توجهی را در بافت‌های مذکور نشان نداد.

جدول ۱: فعالیت آنزیم‌های AST و ALT، در ساعات ۳ و ۲٤ پس از بیهوشی در گروه شاهد و گروه‌های بیهوش شده با غلظت های مختلف اسانس گل میخک بار گذاری شده بر نانو ذرات آهن

زمان آزمایش	ساعت ۳ بعد از بیهوشی				ساعت ۲٤ بعد از بیهوشی			
آنزیم (IU/L)	گروه شاهد	القای بیهوشی با غلظت ۱۰pm	القای بیهوشی با غلظت ۲۵pm	القای بیهوشی با غلظت ۵۰pm	گروه شاهد	القای بیهوشی با غلظت ۱۰ppm	القای بیهوشی با غلظت ۲۵pm	القای بیهوشی با غلظت ۵۰pm
AST	٤٤۰±۰/۱٦۵^{a} ۱/	۱/٤٤۵±۰/۱٤۱^{a}	۱/٤٤۷±۰/۱۱۳^{a}	۱/٤٤۸±۰/۱۲٦^{a}	۱/٤٤۱±۰/۰۹۹^{a}	۱/٤٤۳±۰/۱٦۳^{a}	۱/٤٤۹±۰/۲۱۱^{a}	۱/٤٤۷±۰/۰۸۷^{a*}
ALT	۲٤۰±۰/۰۰۵^{a} ۰/	۰/۲۳۸±۰/۰۱۵^{a}	۰/۲٦۹±۰/۰۰٦^{a}	۰/۲۷۳±۰/۰۳۷^{a}	۰/۲۵۱±۰/۰۲۸^{a}	۰/۲۵٦±۰/۰۰۹^{a}	۰/۲٦۳±۰/۰۰۷^{a}	۰/۲۷۱±۰/۰۰۷^{a}

- حروف متفاوت در هر سطر نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین گروه‌هاست.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

در پژوهش حاضر حداقل غلظت اسانس گل میخک بارگذاری شده بر روی نانو ذرات آهن برای القا بیهوشی در ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان ۱۰ قسمت در میلیون تعیین شد، نتایج بدست آمده از بررسی غلظت آنزیم های ALT و AST در ماهیان گروه شاهد و گروه‌های بیهوش شده با غلظت های مختلف اسانس گل میخک بارگذاری شده بر روی نانو ذرات آهن تغییرات معنی‌داری را نشان نداد، نتایج بدست آمده از آزمایشات بافت‌شناسی نیز موید نتایج فوق است.

هیچ مدرکی مبنی بر اینکه داروهای بیهوشی اختصاصاً قسمتی از مغز را بیشتر تحت تاثیر قرار می‌دهند در دست نیست، اما از آنجایی که بخش قشری مغز مرکز هوشیاری محسوب می گردد، به نظر می رسد که تاثیر داروهای بیهوشی بر روی فعالیت این بخش از مغز یکی از عوامل اصلی در ایجاد بیهوشی است، داروهای بیهوش کننده می توانند بر قسمت های مختلف سلول عصبی از جمله غشا سلول، انتقال دهنده های عصبی، گیرنده ها و کانال های یونی مختلف اثر بگذارند (۲)، این اثرات همیشه مثبت و در کنترل ما نخواهند بود و استعمال بعضی از داروهای بیهوشی ممکن است عوارض جانبی را در پی داشته باشد عوارض جانبی که در داروهای شیمیایی بیهوش کننده مشاهده شده است در اسانس گل میخک ثابت نشده، به عنوان مثال در صورتی که ماهی مدت کوتاهی در معرض اسانس گل میخک قرار گیرد رشد آن تحت تاثیر قرار نمی گیرد (۲۹و ۲۰).

با آسیب سلول‌ها آنزیم هایی به خون ترشح می شود که با اندازه گیری آنها به عنوان شاخص‌های آسیب سلولی می توان به شدت آسیب پی برد. یکی از این آنزیم ها آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) است که به طور مشخص در آسیب های کبدی افزایش می یابد. آنزیم دیگر آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) است که نقش مشابهی را در سایر بافت‌ها ایفا کرده ولی مختص کبد نبوده و در هنگام آسیب های سلولی میزان آنزیم های ALT و AST خون قبل از بروز نشانه‌های بالینی و علائم ظاهری افزایش می یابد (۱۱). با اندازه گیری AST و ALT موجود در سرم می توان ضایعات ناشی از مسمومیت با سموم و فلزات سنگین را تشخیص داد (۸). همچنین در سال‌های اخیر سنجش AST و ALT به یکی از آزمایش ها رایج جهت تشخیص ایمنی داروهای بیهوشی تبدیل شده است (۳۵و ۳٤، ۳۳، ۳۲، ۵).

آهن و ترکیبات آن ممکن است اثرات مضری روی جمعیت ماهیان داشته باشد (۳۱ و ۲۸). انباشتگی زیستی آهن در ماهیان اثبات شده است (۳٦و ۲٤، ۱۹، ۱٦، ۱۰). افزایش حضور آهن در بافت‌های حیوانی ممکن است فرآیندهای فیزیولوژیک طبیعی ماهی را مختل و سلامتی ماهی و مصرف کننده آن را تهدید کند (۲۲). Lappivaara و Marttinen در سال ۲۰۰۵ (۱۵) عنوان کردند آهن موجود در آب می‌تواند موجب تجمع آن در کبد و آبشش ها شده و مقدار هماتوکریت، کاتکول آمین ها و بتااسترادیول پلاسمای خون سفید ماهی را کاهش دهد. نتیجه نهایی این تغییرات به صورت کاهش حساسیت ماهی در برابر تهدیدات محیطی و کاهش واکنش نسبت به آنها بروز می یابد که ناشی از معلولیت در سیستم عصبی ماهی است. Nunes و همکارانش (۲۰۱۰) (۲۲) به منظور بررسی اثرات سولفات آهن بر روی ماهی *Tilapia mossambica* میزان آنزیم های AST و ALT را مورد سنجش قرار دادند، زیرا این آنزیم ها در سوخت و ساز گلوتامات شرکت دارند (۲۵) که تخریب آن می تواند معلولیت در سیستم عصبی را به دنبال داشته باشد. در این بررسی ماهیان در معرض قرار گرفته با غلظت ۰/۰۰۱ گرم در لیتر سولفات آهن در یک دوره ۳۰ روزه، کاهش ۳۵/٤ درصدی در میزان AST و کاهش ۲۹/۱ درصدی در میزان AST را نشان دادند. کاهش این آنزیم ها برای ماهیان در معرض قرار گرفته با ۰/۰۱ گرم در لیتر سولفات آهن به ترتیب برابر ٤۹/۲ درصد و ۳۸/٤ درصد بدست آمد.

در بررسی حاضر ضمن اینکه زمان شروع مراحل مختلف بیهوشی و بازگشت از آن در ماهیانی که ۳ بار با اسانس گل

Archive of SID

www.SID.ir

میخک بارگذاری شده بر نانو ذرات آهن بیهوش شده بودند تغییری را نشان نداد، میزان آنزیم‌های AST و ALT هم در گروه‌های مختلف بیهوشی تغییرات معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نداشت، این دو دلیل، گواهی بر بی اثر بودن مقادیر آهن بکار رفته در ساخت دارو (اسانس گل میخک بارگذاری شده بر نانو ذرات آهن) بر فیزیولوژی و سیستم عصبی ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان است، در پژوهش Nunes و همکاران (۲۰۱۰) (۲۲) ماهیان در معرض قرار گرفته با سولفات آهن، در ابتدا علائمی مثل شنا سریع، آمدن به سطح آب و سرفه را نشان دادند، در حالی که در این پژوهش هیچ یک از این علائم دیده نشد.

آزمایشات گسترده برای بررسی اثرات سمی داروهای جدیدی که قرار است در انسان یا حیوان به کار گرفته شوند ضروری است(۲۱)، یکی از آزمایشات اولیه برای تشخیص ایمنی نانو ذرات، مطالعه بافت‌های بدن بعد از مواجهه با آنهاست (۲۳و ۱۷). داروهای حاوی نانو ذرات بایستی بدون بر جای گذاشتن پس ماند توسط بدن دفع شوند، در غیر این صورت ممکن است در قسمت های معینی از سلول مانند لیپوزوم‌ها یا برخی بافت‌های سیستم فاگوسیتوزی انباشته شوند (۲۱) که می‌تواند ایجاد جراحت هیستوپاتولوژیکی کند.

نانو ذرات بسته به میزان انرژی مغناطیسی‌شان تمایل به ایجاد پیوند و متراکم شدن دارند، نتیجه این تراکم ته نشینی خواهد بود که می تواند سبب انسداد عروق شود. ذرات کوچکتر از ٤ میکرومتر عمدتاً در کبد (۹۰-۶۰ درصد) و طحال (۳۰-۱۰ درصد) جذب می‌شوند. اما اکثر ذرات کوچک متراکم شده و به حدود ۱۰۰ نانومتر ارتقا می یابند، که توسط سلول‌های کبد فاگوسیتوز می‌شوند، در مورد ذرات ۲۰۰ نانومتر باید گفت عمدتاً توسط سینوس‌های سیاهرگی طحال فیلتر می‌شوند. کبد ذرات بزرگتر را سریعتر از بدن دفع می‌کند بنابراین با افزایش سایز ذرات نیمه عمر آنها در پلاسما کمتر می‌شود ذرات بزرگتر فقط به وسیله سلول‌هایی که قادر به فاگوسیتوز هستند دفع می‌شوند در حالی که ذرات کوچکتر از ۱۵۰ نانومتر می‌توانند بوسیله تمام سلول‌های بدن از طریق پینوسیتوز دفع شوند (۲۱). در مطالعه حاضر بررسی‌های هیستوپاتولوژیک ثابت کرد اسانس گل میخک بارگذاری شده بر نانو ذرات آهن عارضه جانبی را در بافت‌های مختلف ماهیان در معرض قرار گرفته با آن ایجاد نمی کند لیکن برای اطمینان بیشتر نیاز به مطالعات تکمیلی می‌باشد که مقادیر آهن را قبل و بعد از آزمایش در بافت ماهیان اندازه‌گیری کند و به بررسی در خصوص احتمال انباشتگی آهن در بافت‌های مختلف و اثرات بلند مدت آن روی ماهی بپردازد. مقایسه نتایج بدست آمده در این پژوهش با مطالعه انجام شده توسط Velisek و همکارانش در سال ۲۰۰۵ (۳٤) که با استفاده از اسانس گل میخک معمولی انجام شد نشان می‌دهد اسانس گل میخک بارگذاری شده بر روی نانو ذرات آهن نسبت به اسانس گل میخک معمولی از ایمنی بیشتری برخوردار می‌باشد و با دوز ۵ برابر دوز توصیه شده در این تحقیق (۱۰ قسمت در میلیون) نیز آسیبی به ماهی وارد نمی‌کند. بررسی اثر اسانس میخک معمولی در میزان آنزیم AST در مورد ماهی قزل‌آلا-رنگین‌کمان کاهش معنی‌دار این آنزیم را در زمان های نمونه گیری بلافاصله بعد از بیهوشی و ۲٤ ساعت بعد از بیهوشی نشان داد و اثرات جانبی روی بافت آبشش ۲۰ درصد از ماهیان دیده شد (۳٤). در حالی که در این تحقیق تغییر معنی‌دار مشاهده نگردید. از سوی دیگر در مورد پژوهش حاضر عوارض ظاهری و رفتاری پس از بیهوشی دیده نشد و در ماهیان بیهوش شده تا ۹٦ ساعت پس از بیهوشی هیچ گونه مرگ و میری مشاهده نشد.

با توجه به گران بودن داروهایی نظیر $MS_{۲۲۲}$ (۱/۵ برابر گرانتر از اسانس گل میخک (۱۲) و وارداتی بودن بسیاری از داروهای پرکاربرد از جمله $MS_{۲۲۲}$ و AQUI-S که باعث خروج ارز از کشور می‌شوند و وابستگی دارویی به خارج را افزایش می‌دهند، تولید دارویی که بتواند ماهی را به صورت کارا، قابل پیش بینی و ایمن بیهوش نماید (۲۷) و قیمت مناسبی داشته باشد. علاوه

www.SID.ir

بر تامین نیازهای داخل کشور می‌تواند برای کشور ارز آوری داشته باشد. لازمه این کار تحقیقات مستمر در زمینه بکارگیری فناوری‌های نوین برای دارورسانی در آبزیان و بومی سازی آنها می‌باشد.

تشکر و سپاسگزاری

بدینوسیله از مدیریت و پرسنل پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون دانشگاه زابل به خاطر تامین بخشی از هزینه‌های این پژوهش و همکاری و مساعدت در مراحل مختلف انجام آن تشکر به عمل می‌آید. همچنین از زحمات و مساعدت های آقایان: دکتر حسن صالحی، دکتر مصطفی خواجه، دکتر بهروز ابطحی، سرکار خانم افسانه برخوردار کارشناس دانشکده علوم دانشگاه زابل، مهندس عبدالعلی راهداری و مهندس فدایی کارشناسان اداره کل شیلات سیستان، مهندس خلیل احمدی‌پور نظام آبادی و بشیر آقاجانی شیرکوهی تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

فهرست منابع

۱- ابطحی، ب.، شریف پور، ع.، آقاجانپور، م.، رسولی، ع.، فقیه زاده، س.، امید بیگی، ر.، نظری، ر.م. (۱۳۸۱): مقایسه LC_{50} اسانس گل میخک و MS_{222} در بچه ماهیان تاسماهی ایرانی، قزل‌آلای‌رنگین‌کمان و کپور معمولی، مجله علمی شیلات ایران، شماره ۱۱: ۱۲-۱.

۲- اخلاقی، م.، میراب بروجردی، م. (۱۳۷۸): بررسی اثر بیهوش کنندگی گل میخک در ماهی و تعیین LC_{50} آن، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵٤ (۲): ۵۲-٤۹.

۳- پوستی، الف. (۱۳٦۸): بافت‌شناسی مقایسه ای و هیستوتکنیک، انتشارات دانشگاه تهران. ص ۵۱۹.

٤- خسروانی زاده، ع.، غفاری، م.، خواجه، م.، ابطحی، ب.، صالحی، ح.، زکی پور رحیم آبادی، الف.،احمدی پور نظام آبادی، خ. (۱۳۹۰): استفاده از اسانس گل میخک (*Eugeni caryophillata*) بارگذاری شده بر نانوذرات آهن جهت القا بیهوشی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مجله علمی شیلات ایران، شماره ٤.

۵- سلطانی، م.، غفاری، م.، خضرائی نیا، پ.، بکایی، س. (۱۳۸۳): مطالعه اثرات بیهوشی اسانس گل میخک هندی بر پارامترهای هماتولوژیک، برخی آنزیم های خون و آسیب شناسی بافت‌های مختلف ماهی کپور معمولی، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۹ (۳): ۲۹۹-۲۹۵.

٦- شریف پور، ع.، سلطانی، م.، عبدالحی، ح.، قیومی، ر. (۱۳۸۱): اثر بیهوش کنندگی اسانس گل میخک (*Eugenia caryophyllata*) در شرایط مختلف pH و درجه حرارت در بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، مجله علمی شیلات ایران، شماره ٤: ۷٤-۵۹.

۷- معتکف کاظمی، ن. (۱۳۸۸): نانو حامل ها در سیستم های دارورسانی، ماهنامه فناوری نانو، شماره ۱٤۸: ۳۸-٤۱.

8- Balint, T., Szegletes, T., Szegletes, Z.S., Halasy, K., Nemcsok, J. (1995): Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin, Aquatic Toxicology, 33(3-4): 279–295.

9- Brown, L. (1993): Anesthesia and Restraint. In: Fish Medicine, (ed. MK Stoskopf), p. 79-90.

10- Burger, J., Gaines, K.F., Boring, C.S., Stephens, W.L., Snodgrass, J., Dixon, C., McMahon, M., Shukla, S., Shukla, T., Gochfeld, M. (2002): Metals in fish from the Savannah River: potential hazards to fish and other receptors, Environ. Res., 89: 85–97.

11- Dufour, D.R., Lott, J.A., Nolte, F.S., Gretch, D.R., Koff, R.S., Seeff, L.B. (2000): Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring, Clin. Chem.46: 2050-2068

12- Erdmann, M.V. (1999): Clove oil: an 'eco-friendly' alternative to cyanide use in the live reef fish industry?, SPC Live Reef fish Bulletin 5:4–7.

13- Gupta, A.K., Gupta, M. (2005): Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, Biomaterials. 26: 3995–4021.

Archive of SID

www.SID.ir

14- Karimi, M.A., Mohammadi, S.Z., Mohadesi, A., Hatefi-Mehrjardi, A., Mazloum-Ardakani, M., Sotudehnia, Korani L. et al. (2011): Determination of silver (I) by flame atomic absorption spectrometry after separation/preconcentration using modified magnetite nanoparticles, Scientia Iranica, Transactions F: Nanotechnology. 18: 790–796.
15- Lappivaara, J., Marttinen, S. (2005): Effects of waterborne iron overload and simulated water conditions on acute physiological stress response of white fish, Coregonus lavaretus, Ecotoxicol. Environ. Saf., 60: 157–168.
16- Lappivaara, J., Kiviniemi, A, Oikari, A. (1999): Bioaccumulation and subchronic physiological effects of waterborne iron overload on white fish exposed to humic and nonhumic water, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 37: 196–204.
17- Lewin, M., Carlesso, N., Tung, C., Tang, X., Cory, D., Scadden, D, Weissleder, R. (2000): Tat peptide derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells, Nature Biotechnology, 18(4): 410-4.
18- Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M. (2010): Recent Advances in Surface Engineering of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications, Journal of the Iranian Chemical Society, 7: 1-27.
19- Mohamed, A.E., Awadallah, R.M, Gaber, S.A. (1990): Chemical and ecological studies on Tilapia nilotica, J. Water S.A. 16: 131–134.
20- Munday, P.L., Wilson, S.K. (1997): Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of pomacentrus amboinesnsis, a coral reef fish, Journal of Fish Biology, 51: 931-938.
21- Neuberger, T., Schopf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., Von Rechenberg, B. (2005): Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system, Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 293: 483–496.
22- Nunes, E.S., Desai, S.N., Desai, P.V. (2010): Effect of ferrous sulphate on aspartate and alanine aminotransferases of brain of Tilapia mossambica, Food and Chemical Toxicology. 48: 490–494.
23- Papatheofanis, F.J., Barmada, R. (1991): Polymorphonuclear leukocyte degranulation with exposure to polymethylmethacrylate nanoparticles, Journal of Biomedical Materials Research. 25(6):761-71.
24- Patin, S.A. (1984): Tilapia as a Bio-assay Organism in Toxicological Studies. Biogeochemical and Toxicological Studies of Water Pollution, Moskva (USSAR), Vniro. P: 39–46.
25- Peng, K.W., Chew, S.F., Lim, C.B., Kuah, S.S.L., Kok, W.K., Ip, Y.K., (1998): The mudskippers Periophthalmodon schlosseri and Boleophthalmus boddaerti can tolerate environmental NH3 concentrations of 446 and 36 IM, respectively, Fish Physiol. Biochem. 19: 59–69.
26- Ross, L.G., Ross, B. (2008). Anaesthesia and Sedation of Aquatic Animals. Third Edition. Wiley-Blackwell. ISBN: 978-1-4051-4938-9.
27- Sladky, K., Swanson, C., Stoskopf, M., Loomis, M., Lewbart, G. (2001): Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetic in red pacu (Piaractus brachypomus), American Journal of Veterinary Research. 62(3): 337-342.
28- Sotero-Santos, R.B., Rocha, O., Povinelli, J. (2007): Toxicity of ferric chloride sludge to aquatic organisms, Chemosphere. 68: 628–636.
29- Soto, C.G., Burhanuddin, S. (1995): Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (Siganus lineatus), Aquaculture. 136: 149–152.
30- Tavallali, H. (2011): Alumina-coated magnetite nanoparticles for solid phase extraction of Cd in water samples, International Journal of ChemTech Research. 3(3): 1647-1651.
31- Van Anholt, R.D., Spanings, F.A., Knol, A.H., Van der Velden, J.A., Wendelaar Bonga, S.E. (2002): Effects of iron sulfate dosage on the water flea (Daphnia magna Straus) and early development of carp (Cyprinus carpio L.), Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 182–192.

www.SID.ir

32- Velisek, J., Svobodova, Z. (2004a): Anaesthesia of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) with 2-phenoxyethanol: Acute Toxicity and Biochemical Blood Profile, Acta Vet. Brno. 73: 379-384.
33- Velisek, J., Svobodova, Z. (2004b): Anaesthesia of Common Carp (Cyprinus carpio L.) with 2-phenoxyethanol: Acute Toxicity and Effects on Biochemical Blood Profile, Acta Vet. Brno. 73: 247-252.
34- Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V. (2005a): Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (Oncorhynchus mykiss), Acta Vet. Brno. 74: 139-146.
35- Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Groch, L., Nepejchalova L. (2005b): Effects of clove oil anaesthesia on common carp (Cyprinus carpio L.), Vet. Med.Czech. 50(6): 269–275.
36- Wepener, V., Van Vuren, J.H.J., Du Preez, H.H. (2001): Uptake and distribution of a copper, iron and zinc mixture in gill, liver and plasma of a freshwater teleost, Tilapia sparmanii, J. Water S. A. 27: 99–108.

Archive of SID

www.SID.ir